

PCT/JP2004/014696

11.11.2004

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2003年12月26日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2003-432383  
[ST. 10/C]: [JP2003-432383]

REC'D 02 DEC 2004

WIPO

PCT

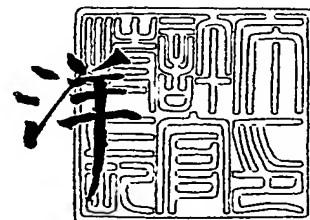
出 願 人  
Applicant(s): サントリー株式会社

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年10月13日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2004-3092039

【書類名】 特許願  
【整理番号】 P03-0121  
【提出日】 平成15年12月26日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 C12N 1/19  
C12N 1/21  
C12N 5/10

【発明者】  
【住所又は居所】 滋賀県大津市国分2丁目931-3  
【氏名】 小埜 栄一郎

【発明者】  
【住所又は居所】 滋賀県大津市仰木の里2-7-4  
【氏名】 田中 良和

【特許出願人】  
【識別番号】 000001904  
【氏名又は名称】 サントリー株式会社

【代理人】  
【識別番号】 100080034  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 原 謙三  
【電話番号】 06-6351-4384

【選任した代理人】  
【識別番号】 100113701  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 木島 隆一

【選任した代理人】  
【識別番号】 100116241  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 金子 一郎

【先の出願に基づく優先権主張】  
【出願番号】 特願2003-341313  
【出願日】 平成15年 9月30日

【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 003229  
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

ピペリトール及び／又はセサミンを生合成する反応を触媒する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。

**【請求項 2】**

ピノレジノール及び／又はピペリトールに対してメチレンジオキシブリッジを形成する反応を触媒する活性を有するタンパク質をコードする請求項 1 に記載の遺伝子。

**【請求項 3】**

以下 (a) または (b) のタンパク質をコードする遺伝子。

(a) 配列番号 1 または 64 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 上記アミノ酸配列において、1 個またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつピペリトール及び／又はセサミンを生合成する反応を触媒する活性を有するタンパク質。

**【請求項 4】**

配列番号 1 または 64 に示されるアミノ酸配列に対して 50 % 以上の相同性を有し、かつピペリトール及び／又はセサミンを生合成する反応を触媒する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。

**【請求項 5】**

配列番号 2 または 65 に示される塩基配列をオープンリーディングフレーム領域として有する遺伝子。

**【請求項 6】**

配列番号 2 または 65 に示される塩基配列、もしくは配列番号 1 または 64 に示されたアミノ酸配列をコードする塩基配列、またはそれら塩基配列の一部に対して、ストリンジェンシーな条件下で、ハイブリダイズし、ピペリトール及び／又はセサミンを生合成する反応を触媒する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。

**【請求項 7】**

ゴマ由来である請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の遺伝子。

**【請求項 8】**

請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子によりコードされるタンパク質。

**【請求項 9】**

以下 (a) または (b) のタンパク質。

(a) 配列番号 1 または 64 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 上記アミノ酸配列において、1 個またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつピペリトール及び／又はセサミンを生合成する反応を触媒する活性を有するタンパク質。

**【請求項 10】**

請求項 8 または 9 に記載のタンパク質を認識する抗体。

**【請求項 11】**

請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子を含有する組換え発現ベクター。

**【請求項 12】**

請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子を含有する組換え発現ベクターを含む形質転換体。

**【請求項 13】**

請求項 12 に記載の形質転換体を培養し、又は生育させ、該形質転換体からピペリトール及び／又はセサミンを生合成する反応を触媒する活性を有するタンパク質を採取する工程を含むタンパク質の生産方法。

**【請求項 14】**

請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子が導入された植物もしくはこれと同じ性質を有する該植物の子孫またはそれらの組織。

**【請求項 15】**

請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子、あるいは請求項 8 または 9 に記載のタンパク質を用いてピペリトールまたはセサミンを生合成する工程を有する、ピペリトール及び／又はセサミンの生産方法。

【請求項 16】

請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子を用いることにより、リグナン高含有の形質転換体を生産する方法。

【請求項 17】

請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子を用いることにより、ピペリトール・セサミン高含有の植物体を生産する方法。

【請求項 18】

請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子を用いることにより、リグナン低含有の形質転換体を生産する方法。

【請求項 19】

請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子を用いることにより、ピペリトール・セサミン低含有の植物体を生産する方法。

【請求項 20】

請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子を用いて、ゴマを育種する方法。

【請求項 21】

請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子における少なくとも一部の塩基配列またはその相補配列をプローブとして用いた遺伝子検出器具。

## 【書類名】明細書

【発明の名称】リグナン生合成酵素をコードする遺伝子、およびその利用

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、ゴマのピペリトールおよびセサミンの生合成酵素、当該タンパク質をコードする遺伝子、並びに当該タンパク質および遺伝子の利用に関するものである。

## 【背景技術】

## 【0002】

一般的にゴマ (*Sesamum indicum*) として知られている植物は、ゴマ科ゴマ属 (*Sesamum*) に属している。原産地は中央アフリカで、6000年ほどの歴史をもつ最古の栽培油糧植物であり、世界中で栽培されてきた。

## 【0003】

ゴマ種子の成分としては、約50%の脂質と、約20%のタンパク質が含まれている。このゴマ種子の脂質の主成分はオレイン酸とリノール酸を主体とするトリグリセリドであり、ビタミンB1、B2、Eなども含まれている。なかでもゴマ種子脂質には、特徴的な成分としてセサミン、セサモリンなどのリグナンと総称される植物の二次代謝物が含まれている。

## 【0004】

このセサミンは多様な生理活性を有することが明らかにされており、コレステロール代謝、肝機能及び免疫機能改善に効果があることが知られている（例えば、非特許文献1参照）。セサミンをゴマ種子あるいはゴマ種子の絞り粕から分離精製する方法はすでに実用化されており（例えば、特許文献1、2参照）、セサミンを主成分とするアルコール分解促進作用を中心とした肝機能活性増強剤が市販されている。また、セサミン以外のゴマリグナン（セサミノール、セサモリンなど）についても生理活性作用が報告されている（例えば、非特許文献2参照）。

## 【0005】

リグナンの生合成についてはある程度の知見がある（例えば、非特許文献3参照）。図1に、一般的に知られているリグナンの生合成の模式図を示す。リグナンはフェニルプロパノイド化合物を出発物質として合成され、植物においては植物の生体防御機構に寄与していると考えられている。図1に示すように、コニフェリルアルコール1が重合して合成されるピノレジノール2が生合成上は最初のリグナンであり、ピノレジノール2から植物種に特有な生合成経路を経て多様なリグナンが合成されることが知られている。

## 【0006】

また、セサミンの生合成に関しては、図1に示すように、(+) -ピノレジノール2にピペリトール合成酵素3が作用することによりメチレンジオキシブリッジが一箇所形成され（図中、円で囲んだ領域）ピペリトール4が合成される。次いでこのピペリトール4にセサミン合成酵素5が作用することによりメチレンジオキシブリッジがさらにもう一箇所形成されてセサミン6が合成されることが知られている。さらに、上記両者の反応を触媒する酵素がチトクロームP450であるが、2種類のチトクロームP450であることがゴマ種子の膜画分を用いた実験で示されている（例えば、非特許文献4参照）。

## 【0007】

上記メチレンジオキシブリッジの形成は、アルカロイドやフラボノイドの生合成においてしばしば見られる。例えば *Eschscholtzia californica* の培養細胞の膜画分には (S)-scoulerine から (S)-cheilanthifoline を、(S)-cheilanthifoline から (S)-stylopine を、ともにメチレンジオキシブリッジを形成することにより生成する反応を触媒するチトクロームP450が存在することが知られている（例えば、非特許文献5参照）。

## 【0008】

また、ヒヨコマメ (*Cicer arietinum*) の培養細胞の膜画分には、カリコシン (calycosin) にメチレンジオキシブリッジを形成しシュードパプティゲニンを、プラテンセイン (pratenin) にメチレンジオキシブリッジを形成し5'-ヒドキシシュードパプティゲニンを、

生成する反応を触媒する酵素が存在し、その酵素がチトクローム P 450 であることが報告されている（例えば、非特許文献 6 参照）。

【0009】

また、*Linum flavum* の培養細胞におけるデオキシポドフィロトキシン (deoxypodophyllo toxin) 6-水酸化酵素はチトクローム P 450 であることが示唆されている（例えば、非特許文献 7 参照）。

【0010】

また、ベンジルイソキノリンアルカロイドであるベルベリンの生合成に関わり、(S)-tetrahydrocolimbamine からメチレンジオキシブリッジを形成し (S)-tetrahydroberberine を合成する酵素はやはりチトクローム P 450 であり、これをコードする遺伝子が *Coptis japonica* からクローニングされている（例えば、非特許文献 8 参照）。

【0011】

上述のような種々の反応を触媒するチトクローム P 450 は多様な分子種からなるスーパーファミリーを形成しており、そのアミノ酸配列の相同性によって分類される。概ね同一性が 40% 以上であるものをファミリー、55% 以上であるものをサブファミリーとして分類し、ファミリーは数字で、サブファミリーはアルファベットで示される（例えば、非特許文献 9 参照）。各ファミリー及びその相互関係については、図 3 に系統樹として示す。例えば、上述したベルベリンの生合成に関わるチトクローム P 450 は CYP 719 に属するとされる。

【0012】

チトクローム P 450 は、ひとつの植物種に数百分子種存在する。けれども、図 4 に示すように、これらのうち生化学的あるいは生理的な機能が同定されているチトクローム P 450 分子種は少数である。

【0013】

ゴマ由来のチトクローム P 450 としては、本発明に関係するセサミンやピペリトールの合成反応とは直接的には関係しないが、p-coumarate 3-hydroxylase をコードする遺伝子 (AY065995) がクローニングされている。

【0014】

他の生物種におけるチトクローム P 450 遺伝子のクローニングとその機能解析はいくつかの報告がある。

【0015】

例えば、ペチュニア由来のフラボノイド 3'、5' 水酸化酵素 (F 3'、5' H) 遺伝子（例えば、非特許文献 10 参照）、フラボノイド 3' 水酸化酵素 (F 3' H、CYP 75 B) 遺伝子（例えば、非特許文献 11 参照）、カンゾウ由来の (2S)-フラバノン 2 水酸化酵素 (F 2 H、CYP 93 B1)（非特許文献 12）、2-ヒドロキシイソフラバノン合成酵素 (IFS、CYP 93 C2)（非特許文献 13）、イソフラボン 2' 水酸化酵素 (I 2' H、CYP 81 E1)（非特許文献 14）をコードする遺伝子がクローニングされている。また、キンギョソウから I 2' H を用いてフラボン合成酵素 I I (FNS II、CYP 93 B3)（非特許文献 15）をコードする遺伝子がクローニングされている。

【0016】

また、CYP 81 ファミリーに属するチトクローム P 450 のアミノ酸配列は HYPERLINK "http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html" http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html に数多く記載されている。それらの機能としては、*Helianthus tuberosus* 由来の CYP 81 B1 が脂肪酸の水酸化反応を触媒すること（非特許文献 16）、前述の I 2' H が CYP 81 E に属することが知られている。

【0017】

けれども、これらのチトクローム P 450 が触媒する反応は、上述したようなメチレンジオキシブリッジ形成の反応ではない。

【0018】

リグナンの生合成に関わる酵素の遺伝子としては、ピノレジノールの合成に寄与する dirigent protein が、レンギョウ (*Forsythia intermedia*) などから報告されている (例えば、非特許文献 17、特許文献 3 参照)。また、レンギョウのピノレジノールラリシレジノール還元酵素の遺伝子 (非特許文献 18、特許文献 3)、*Thuja plicata* のピノレジノールラリシレジノール還元酵素の遺伝子 (非特許文献 19) についても報告がなされている。組換えセコイソラリシレジノールデヒドロゲナーゼ、およびその使用方法についても報告がなされている (特許文献 4、非特許文献 20)。

【特許文献 1】特開 2001-139579 公報 (公開日: 2001 年 5 月 22 日)

【特許文献 2】特開平 10-7676 号公報 (公開日: 平成 10 (1998) 年 1 月 13 日)

【特許文献 3】特表 2001-507931 公報 (公表日: 2001 年 6 月 19 日)

【特許文献 4】特表 2002-512790 公報 (公表日: 2002 年 5 月 8 日)

【非特許文献 1】並木満夫著 「ゴマ その科学と機能性」丸善プラネット社出版

【非特許文献 2】日本農芸化学会誌 76 805-813 2002

【非特許文献 3】Lignans: biosynthesis and function, Comprehensive natural products chemistry vol 1. 640-713, 1999

【非特許文献 4】Phytochemistry, 49, 387, 1998

【非特許文献 5】Phytochemistry, 30, 2953, 1991

【非特許文献 6】Phytochemistry, 41, 457, 1996

【非特許文献 7】Planta, 214, 288, 2001

【非特許文献 8】J Biol Chem. 2003, May 5 [Epub ahead of print].

【非特許文献 9】Nelson et al. Pharmacogenetics 6, 1-42, 1996

【非特許文献 10】Nature 366 276-279, 1993

【非特許文献 11】Plant J. 19, 441-451, 1999

【非特許文献 12】FEBS Letters, 431, 287, 1998

【非特許文献 13】Plant Physiology, 121, 821, 1999

【非特許文献 14】Biochemical and Biophysical Research Communications, 251, 67, 1998

【非特許文献 15】Plant and Cell Physiology, 40, 1182, 1999

【非特許文献 16】J. Biol. Chem. 273, 7260, 1998

【非特許文献 17】Plant Physiol. 123, 453, 2000

【非特許文献 18】J. Biol. Chem. 271, 29473, 1996

【非特許文献 19】J. Biol. Chem. 271, 618, 1999

【非特許文献 20】J. Biol. Chem. 2001 Apr 20;276(16):12614-23, Epub 2001 Jan 18.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0019】

上述したように、セサミンは多様な生理活性を有することが明らかにされ、様々な改善効果をもつ物質である。しかしながら、現在のセサミンの生産方法は、上述したようなゴマ種子から得る方法しかない。従ってセサミンの生産はゴマ種子に依存し、セサミンの生産量の拡大と生産コストの削減には限界がある。

【0020】

つまり、上述したようなゴマ種子においてセサミンの生合成に関与することが明らかとなった 2 種のチトクローム P 450 について、これらをコードする遺伝子がクローニングされたり、酵素が精製されたことはない。また、上述したような他の生物種においてメチレンジオキシブリッジを形成するチトクローム P 450 についても、これをコードする遺伝子がクローニングされたり、酵素が精製されたことはない。また、上述したような他のチトクローム P 450 に関しても、これをコードする遺伝子がクローニングされたり、酵素が精製されたことはない。さらに、上述したようなクローニングされた他の生物種にお

けるリグナンの生合成酵素においても、セサミンやピペリトールの合成に関わるものではなかった。

#### 【0021】

ゴマ種子由来の遺伝子についてもクローニングされたものがいくつかあり、例えば、種子の貯蔵タンパク質であるグロブリンとしてAF240004、AF240005、AF240006など、脂質の合成や貯蔵に関わる遺伝子としてはオレオシン (J Biochem. 122:819-24. 1997)、アシルキャリアータンパク質不飽和化酵素 (Plant Cell Physiol. 1996 37, 201-5)、ステロレオシン (Plant Physiol. 2002 128:1200-11)、脂肪酸不飽和化酵素 (Plant Sci. 161 935-941 (2001)) などがあるが、これらはリグナン合成に関わっている遺伝子ではない。

#### 【0022】

したがって、リグナン合成に関与する酵素等をコードする遺伝子は、未だ明らかになっておらず、その同定が強く望まれていた。

#### 【0023】

本発明は、上記の問題点に鑑みなされたものであり、その目的は、リグナン類の水酸基とメチル基からメチレンジオキシブリッジを形成する反応を触媒する酵素、好ましくはピノレジノールからピペリトールおよびピペリトールからセサミンへの反応を触媒する酵素の遺伝子を同定し、得られたゴマ由来チトクローム P 450 遺伝子を用いて、セサミン及びピペリトールを組換え生物などにより生産する方法などを実現することである。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0024】

本発明者等は、上記課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、ゴマ種子 cDNA ライブラリーからゴマ種子チトクローム P 450 遺伝子群 (以下、S i P 遺伝子) を取得し、酵母において発現させた。そして、その組換え酵母からミクロソーム画分を回収し、ピノレジノールまたはピペリトールと反応させ、それぞれからピペリトールまたはセサミンが生成されるかどうかを H P L C により分析を行った。その結果、ピノレジノールからピペリトール、およびピペリトールからセサミンへの二つの反応を触媒するタンパク質およびその遺伝子を同定することができ、本発明を完成させるに至った。

#### 【0025】

すなわち、本発明は産業上有用な物質または方法として、下記 1) ~ 18) の発明を含むものである。

#### 【0026】

1) ピペリトール及び／又はセサミンを生合成する反応を触媒する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子 (ピノレジノールからピペリトールを、及び／又はピペリトールからセサミンを生合成する反応を触媒する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子)。

#### 【0027】

2) ピノレジノール及び／又はピペリトールに対してメチレンジオキシブリッジを形成する反応を触媒する活性を有するタンパク質をコードする、上記 1) に記載の遺伝子。

#### 【0028】

3) 以下 (a) または (b) のタンパク質をコードする遺伝子。

(a) 配列番号 1 または 64 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 上記アミノ酸配列において、1 個またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつピペリトール及び／又はセサミンを生合成する反応を触媒する活性を有するタンパク質。

#### 【0029】

4) 配列番号 1 または 64 に示されるアミノ酸配列に対して 50% 以上の相同性を有し、かつピペリトール及び／又はセサミンを生合成する反応を触媒する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。

#### 【0030】



5) 配列番号 2 または 65 に示される塩基配列をオープンリーディングフレーム領域として有する遺伝子。

【0031】

6) 配列番号 2 または 65 に示される塩基配列、もしくは配列番号 1 または 64 に示されたアミノ酸配列をコードする塩基配列、またはそれら塩基配列の一部分に対して、ストリンジェンシーな条件下で、ハイブリダイズし、ピペリトール及び／又はセサミンを生合成する反応を触媒する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。

【0032】

7) ゴマ由来である、上記 1) ～ 6) のいずれかに記載の遺伝子。

【0033】

8) 上記 1) ～ 7) のいずれかに記載の遺伝子によりコードされるタンパク質。

【0034】

9) 以下 (a) または (b) のタンパク質。

(a) 配列番号 1 または 64 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 上記アミノ酸配列において、1 個またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつピペリトール及び／又はセサミンを生合成する反応を触媒する活性を有するタンパク質。

【0035】

10) 上記 8) または 9) に記載のタンパク質を認識する抗体。

【0036】

11) 上記 1) ～ 7) のいずれかに記載の遺伝子を含有する組換え発現ベクター。

【0037】

12) 上記 1) ～ 7) のいずれかに記載の遺伝子を含有する組換え発現ベクターを含む形質転換体。

【0038】

13) 上記 12) に記載の形質転換体を培養し、又は生育させ、該形質転換体からピペリトール及び／又はセサミンを生合成する反応を触媒する活性を有するタンパク質を採取する工程を含むタンパク質の生産方法。

【0039】

14) 上記 1) ～ 7) のいずれかに記載の遺伝子が導入された植物もしくはこれと同じ性質を有する該植物の子孫またはそれらの組織。

【0040】

15) 上記 1) ～ 7) のいずれかに記載の遺伝子、あるいは 8) または 9) に記載のタンパク質を用いてピペリトールまたはセサミンを生合成する工程を有する、ピペリトールまたはセサミンの生産方法。

【0041】

16) 上記 1) ～ 7) のいずれかに記載の遺伝子を用いることにより、リグナン高含有の形質転換体を生産する方法。

【0042】

17) 上記 1) ～ 7) のいずれかに記載の遺伝子を用いることにより、ピペリトール・セサミン高含有の植物体を生産する方法。

【0043】

18) 上記 1) ～ 7) のいずれかに記載の遺伝子を用いることにより、リグナン低含有の形質転換体を生産する方法。

【0044】

19) 上記 1) ～ 7) のいずれかに記載の遺伝子を用いることにより、ピペリトール・セサミン低含有の植物体を生産する方法。

【0045】

20) 上記 1) ～ 7) のいずれかに記載の遺伝子を用いて、ゴマを育種する方法。

【0046】

21) 上記1)～7)のいずれかに記載の遺伝子における少なくとも一部の塩基配列またはその相補配列をプローブとして用いた遺伝子検出器具。

【発明の効果】

【0047】

セサミンは、多様な生理活性が明らかにされ、様々な改善効果をもつ物質であることが既に知られており、本発明によって、ピノレジノールからピペリトールを、またはピペリトールからセサミンを生合成する反応を触媒する酵素の遺伝子が同定されたことから、この同定されたゴマ由来チトクローム P450 遺伝子 (S i P 遺伝子) を用いて、セサミン及びピペリトールを組換え生物などにより生産することを実現できるため、セサミンの生産量の拡大及び生産コストの削減という効果を奏する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0048】

本発明の実施の形態について以下に説明するが、本発明は以下の記載に限定されるものではない。

【0049】

(1) 本発明に係る遺伝子および該遺伝子がコードするタンパク質の構造

本発明に係る遺伝子は、ピペリトール及び／又はセサミンを生合成する反応を触媒する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子である。ここでいう「ピペリトール及び／又はセサミンを生合成する反応」とは、ピノレジノールからピペリトールを、及び／又はピペリトールからセサミンを生合成する反応をいい、より詳細には、ピノレジノール及び／又はピペリトールに対してメチレンジオキシブリッジを形成する反応いう。本実施の形態では、本発明に係る遺伝子として、ゴマ種子由来のピペリトール及びセサミン生合成タンパク質をコードする遺伝子 S i P 189 (配列番号2に示す塩基配列) を挙げて説明する。なお本願では、オープンリーディングフレーム領域を、開始コドンから終止コドン直前までの領域とする。

【0050】

(1-1) 本発明に係る遺伝子

本発明の遺伝子としては、例えば配列番号1または64に示されるアミノ酸配列をコードするものが挙げられる。しかしながら、複数個のアミノ酸の付加、欠失および／または他のアミノ酸との置換によって修飾されたアミノ酸配列を有するタンパク質も、もとのタンパク質と同様の酵素活性を維持することが知られている。すなわち本発明には、ピペリトールおよびセサミン生合成活性を有しているタンパク質をコードする遺伝子である限り、(a) 配列番号1または64に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子、(b) 上記アミノ酸配列において、1個またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつピペリトール及び／又はセサミンを生合成する反応を触媒する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子も含まれる。このような遺伝子として、例えば、配列番号2または65に示される塩基配列をオープンリーディングフレーム (ORF) として有する遺伝子が挙げられる。なお、後述する実施例でも説明するが、本発明に係る遺伝子は、チトクローム P450 タンパク質をコードする遺伝子とも換言できる。

【0051】

ここで、「1個又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加された」とは、部位特異的突然変異誘発法 (Hashimoto-Gotoh, Gene 152, 271-275(1995)他) 等の公知の変異タンパク質作製法により置換、欠失、挿入、及び／又は付加できる程度の数 (好ましくは10個以下、より好ましくは7個以下、さらに好ましくは5個以下) のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されることを意味する。したがって、上記(b)のタンパク質をコードする遺伝子は、上記(a)のタンパク質の変異タンパク質をコードする遺伝子である。また、ここでいう「変異」は、主として公知の変異タンパク質作製法により人為的に導入された変異を意味するが、天然から単離精製された同様の変異タンパク質をコードする遺伝子であってもよい。

## 【0052】

なお、本発明にかかる遺伝子は、2本鎖DNAのみならず、それを構成するセンス鎖およびアンチセンス鎖といった各1本鎖DNAやRNAを包含する。アンチセンス鎖は、プローブとして又はアンチセンス薬剤として利用できる。DNAには、例えばクローニングや化学合成技術、又はそれらの組み合わせで得られるようなcDNAやゲノムDNAなどが含まれる。さらに、本発明にかかる遺伝子は、上記(a)又は(b)のアミノ酸をコードする配列以外に、非翻訳領域(UTR)の配列やベクター配列(発現ベクター配列を含む)などの配列を含むものであってもよい。

## 【0053】

また本発明に係る遺伝子には、配列番号1または64に示されるアミノ酸配列に対して、20%以上、好ましくは50%以上、さらに好ましくは60%または70%以上の相同性を有するタンパク質であって、かつピペリトール及び/又はセサミンを生合成する反応を触媒する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子も含まれ、かかる遺伝子もリグナン量制御および植物育種への利用することができる。なおここで「相同性」とは、アミノ酸配列中に占める同じ配列の割合であり、この値が高いほど両者は近縁であるといえる。

## 【0054】

また、本発明に係る遺伝子には、配列番号1または64に記載の塩基配列もしくはそこに記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列、またはそれらの塩基配列の一部分、例えばコンセンサス領域の6個以上のアミノ酸をコードする塩基配列に対して、ストリンジェンシーな条件下で、ハイブリダイズし、かつピペリトール及び/又はセサミンを生合成する反応を触媒する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子も含まれる。なお、上記「ストリンジェンシーな条件」とは、少なくとも80%の同一性、好ましくは少なくとも95%の同一性、最も好ましくは少なくとも97%の同一性が配列間に存在するときのみハイブリダイゼーションが起こることを意味する。具体的には、例えば、5×SSC、50℃の条件下でハイブリダイズして得られるという条件を挙げることができる。

## 【0055】

上記ハイブリダイゼーションは、J.Sambrook et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1989)に記載されている方法等、従来公知の方法で行うことができる。通常、温度が高いほど、塩濃度が低いほどストリンジェンシーは高くなる(ハイブリダイズし難くなる)。なお、適切なハイブリダイゼーション温度は塩基配列やその塩基配列の長さによって異なり、例えばアミノ酸6個をコードする18塩基からなるDNAフラグメントをプローブとした場合には50℃以下の温度が好ましい。

## 【0056】

このようなハイブリダイゼーションによって選択される遺伝子としては、天然由来のもの、例えば植物由来のもの、例えば、コケ科植物由来の遺伝子が挙げられるが、植物以外の由来であってもよい。また、ハイブリダイゼーションによって選択される遺伝子はcDNAであってもよく、ゲノムDNAであってもよい。

## 【0057】

(1-2) 本発明に係るタンパク質

本発明に係るタンパク質は、上記(1-1)欄で説明した遺伝子にコードされるタンパク質であればよい。このようなタンパク質であれば、ピノレジノールからピペリトールを、またはピペリトールからセサミンを生合成する反応を触媒する活性を有する。なお、本発明には、ピノレジノールまたはピペリトールに対してメチレンジオキシブリッジを形成する反応を触媒する活性を有するタンパク質も含まれる。かかるタンパク質として、例えば、上述の(a)配列番号1または64に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質、または(b)上記アミノ酸配列において、1個またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び/又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつピペリトール及び/又はセサミンを生合成する反応を触媒する活性を有するタンパク質を挙げることができる。

## 【0058】

本発明に係るタンパク質は、上記(1-1)欄で説明した遺伝子を宿主細胞に導入して、そのタンパク質を細胞内発現させた状態であってもよいし、細胞、組織などから単離精製された状態であってもよい。また、上記宿主細胞での発現条件によっては、本発明にかかるタンパク質は、他のタンパク質とつながった融合タンパク質であってもよい。さらに本発明にかかるタンパク質は、化学合成されたものであってもよい。

#### 【0059】

なお、本発明に係るタンパク質は、アミノ酸がペプチド結合してなるポリペプチドであればよいが、これに限定されるものではなく、ポリペプチド以外の構造を含む複合タンパク質であってもよく、付加的なポリペプチドを含むものであってもよい。ポリペプチドが付加される場合としては、例えば、HisやMyc、Flag等によって本発明に係るタンパク質がエピトープ標識されるような場合が挙げられる。

#### 【0060】

##### (2) 本発明に係る遺伝子およびタンパク質の取得方法

本発明に係る遺伝子およびタンパク質の取得方法(生産方法)は特に限定されるものではないが、代表的な方法として次に示す各方法を挙げることができる。

#### 【0061】

##### (2-1) 遺伝子の取得方法

本発明に係る遺伝子の取得方法は、生来の塩基配列を有する遺伝子については、後述する実施例に具体的に示すように、例えばcDNAライブラリーのスクリーニングによって得られる。

#### 【0062】

また、本発明にかかる遺伝子を取得する方法として、PCR等の増幅手段を用いる方法を挙げることができる。例えば、本発明にかかる遺伝子のcDNA配列のうち、5'側および3'側の配列(またはその相補配列)の中からそれぞれプライマーを調製し、これらプライマーを用いてゲノムDNA(またはcDNA)等を鋳型にしてPCR等を行い、両プライマー間に挟まれるDNA領域を増幅することで、本発明にかかる遺伝子を含むDNA断片を大量に取得できる。

#### 【0063】

また遺伝子配列情報をもとにして、該配列を持つポリヌクレオチドを、公知の化学合成を用いて合成してもよい。

#### 【0064】

修飾されたアミノ酸配列を有する酵素をコードするDNAについては、生来の塩基配列を有するDNAを基礎として、常用の部位特定変異誘発やPCR法を用いて合成することができる。例えば、修飾を導入したいDNA断片を生来のcDNAまたはゲノムDNAの制限酵素処理によって得て、これを鋳型にして、所望の変異を導入したプライマーを用いて部位特異的変異誘発またはPCR法を実施し、所望の修飾を導入したDNA断片を得る。その後、この変異を導入したDNA断片を目的とする酵素の他の部分をコードするDNA断片と連結すればよい。あるいはまた、短縮されたアミノ酸配列からなる酵素をコードするDNAを得るには、例えば目的とするアミノ酸配列より長いアミノ酸配列、例えば全長アミノ酸配列をコードするDNAを所望の制限酵素により切断し、その結果得られたDNA断片が目的とするアミノ酸配列の全体をコードしていない場合は、不足部分の配列からなるDNA断片を合成し、連結すればよい。

#### 【0065】

また、得られた遺伝子は大腸菌または酵母での遺伝子発現系を用いて発現させ、酵素活性を測定することにより、得られた遺伝子がピノレジノールからピペリトールを、またはピペリトールからセサミンを生合成する反応を触媒する活性を有するタンパク質をコードすることを確認することができる。さらに、当該遺伝子を発現させることにより、遺伝子産物であるピノレジノールからピペリトールを、またはピペリトールからセサミンを生合成する反応を触媒する活性を有するタンパク質を得ることができる。

#### 【0066】

あるいはまた、配列番号 1 または 64 に記載のアミノ酸配列に対する抗体を用いて他の生物のピペリトールおよびセサミン合成酵素遺伝子をクローン化することもできる。

#### 【0067】

##### (2-2) タンパク質の取得方法

本発明に係るタンパク質を取得する方法（生産方法）は、特に限定されるものではないが、まず、本発明に係るタンパク質を発現する細胞、組織などから単純精製する方法を挙げることができる。なお、本発明に係るタンパク質を発現する細胞、組織は、自然発生型のものでもかまわないし、例えば、組み換えバキュロウイルスに感染した細胞、組織であってもかまわない。精製方法も特に限定されるものではなく、上述したように本発明にかかる遺伝子を含む発現ベクターによって形質転換された宿主を培養、栽培または飼育し、培養物から常法に従って、例えば濾過、遠心分離、細胞の破碎、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等により目的とするタンパク質を回収、精製すればよい。

#### 【0068】

また、本発明に係るタンパク質を取得する方法として、遺伝子組み換え技術等を用いる方法も挙げられる。この場合、例えば、本発明に係る遺伝子をベクターなどに組み込んだ後、公知の方法により、発現可能に宿主細胞に導入し、細胞内で翻訳されて得られる上記タンパク質を精製するという方法などを採用することができる。遺伝子の導入（形質転換）や遺伝子の発現等の具体的な方法については後述する。

#### 【0069】

あるいはまた、配列番号 1 または 64 に記載のアミノ酸配列に対する抗体を用いても、ピペリトールおよびセサミン合成酵素のタンパク質を得ることができる。さらに抗体を用いて、他の生物のピペリトール及びセサミン合成酵素および当該酵素をコードする遺伝子をクローニングすることもできる。

#### 【0070】

なお、このように宿主に外来遺伝子を導入する場合、外来遺伝子の発現のため宿主内で機能するプロモーターを組み入れた発現ベクター及び宿主には様々なものが存在するので、目的に応じたものを選択すればよい。産生されたタンパク質を精製する方法は、用いた宿主、タンパク質の性質によって異なるが、タグの利用等によって比較的容易に目的のタンパク質を精製することが可能である。

#### 【0071】

変異タンパク質を作製する方法についても、特に限定されるものではない。例えば、部位特異的突然変異誘発法（Hashimoto-Gotoh, Gene 152, 271-275 (1995) 他）、PCR法を利用して塩基配列に点変異を導入し変異タンパク質を作製する方法、あるいはトランスポゾンの挿入による突然変異株作製法などの周知の変異タンパク質作製法を用いることができる。これら方法を用いることによって、上記（a）のタンパク質をコードする cDNA の塩基配列において、1 またはそれ以上の塩基が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されるように改変を加えることによって作製することができる。また、変異タンパク質の作製には、市販のキットを利用してもよい。

#### 【0072】

また、本発明に係るタンパク質の取得方法は、上述に限定されることなく、例えば、市販されているペプチド合成器等を用いて化学合成されたものであってもよい。またその他の例としては、無細胞系のタンパク質合成液（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 5598-5602 (1981)、J. Biol. Chem., 253, 3753-3756 (1978) など）を利用して、本発明にかかる遺伝子から本発明にかかるタンパク質を合成してもよい。

#### 【0073】

##### (3) 本発明に係る抗体

本発明にかかる抗体は、上記（1-2）欄で説明したタンパク質、例えば、上記（a）又は（b）のタンパク質、またはその部分タンパク質、あるいは部分ペプチドを抗原として、公知の方法によりポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体として得られる抗体

である。公知の方法としては、例えば、文献 (Harlowらの「Antibodies : A laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York(1988))、岩崎らの「単クローン抗体ハイブリドーマとELISA、講談社(1991)」」に記載の方法が挙げられる。このようにして得られる抗体は、本発明にかかるタンパク質の検出・測定などに利用できる。

#### 【0074】

##### (4) 本発明に係る組換えベクター

本発明にかかる組換え発現ベクターは、上記(1-1)欄で説明した遺伝子、例えば、上記(a)又は(b)のタンパク質をコードする本発明の遺伝子を含むものである。例えば、cDNAが挿入された組換え発現ベクターが挙げられる。組換え発現ベクターの作製には、プラスミド、ファージ、又はコスミドなどを用いることができるが特に限定されるものではない。また、作製方法も公知の方法を用いて行えばよい。

#### 【0075】

ベクターの具体的な種類は特に限定されるものではなく、ホスト細胞(宿主細胞)中で発現可能なベクターを適宜選択すればよい。すなわち、ホスト細胞の種類に応じて、確実に遺伝子を発現させるために適宜プロモーター配列を選択し、これと本発明にかかる遺伝子を各種プラスミド等に組み込んだものを発現ベクターとして用いればよい。

#### 【0076】

本発明にかかる遺伝子がホスト細胞に導入されたか否か、さらにはホスト細胞中で確実に発現しているか否かを確認するために、各種マーカーを用いてもよい。例えば、ホスト細胞中で欠失している遺伝子をマーカーとして用い、このマーカーと本発明にかかる遺伝子とを含むプラスミド等を発現ベクターとしてホスト細胞に導入する。これによってマーカー遺伝子の発現から本発明にかかる遺伝子の導入を確認することができる。あるいは、本発明にかかるタンパク質を融合タンパク質として発現させてもよく、例えば、オワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質GFP (Green Fluorescent Protein) をマーカーとして用い、本発明にかかるタンパク質をGFP融合タンパク質として発現させてもよい。

#### 【0077】

上記ホスト細胞は、特に限定されるものではなく、従来公知の各種細胞を好適に用いることができる。具体的には、原核生物としては細菌、例えばエシェリヒア (*Escherichia*) 属に属する細菌、例えば大腸菌 (*Escherichia coli*)、バシルス (*Bacillus*) 属微生物、例えばバシルス・サブシルス (*Bacillus subtilis*) など常用の宿主を用いることができる。真核性宿主としては、下等真核生物、例えば真核性微生物、例えば真菌である酵母または糸状菌が使用できる。酵母としては例えばサッカロミセス (*Saccharomyces*) 属微生物、例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 等が挙げられ、また糸状菌としてはアスペルギルス (*Aspergillus*) 属微生物、例えばアスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、ペニシリウム (*Penicillium*) 属微生物が挙げられる。さらに動物細胞または植物細胞が使用でき、植物細胞としては、ゴマ科植物、イネ科植物など種々の植物細胞が利用可能であり、また動物細胞としては、マウス、ハムスター、サル、ヒト等の細胞系が使用される。さらに昆虫細胞、例えばカイコ細胞、またはカイコの成虫それ自体も使用される。

#### 【0078】

本発明の組換え発現ベクター、それらを導入すべき宿主の種類に依存して発現制御領域、例えばプロモーターおよびターミネーター、複製起点等を含有する。細菌用発現ベクターのプロモーターとしては、常用のプロモーター、例えばtrcプロモーター、tacプロモーター、lacプロモーター等が使用され、酵母用プロモーターとしては、例えばグリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) プロモーター、PH05プロモーター等が使用され、糸状菌用プロモーターとしては例えばアミラーゼ、trpC等が使用される。また動物細胞宿主用プロモーターとしてはウイルス性プロモーター、例えばSV40アーリープロモーター、SV40レートプロモーター等が使用される。発現ベクターの作製は制限酵素、リガーゼ等を用いて常用に従って行うことができる。また、発現ベクターによる宿主の形質転換も常法に従って行うことができる。



## 【0079】

上記発現ベクターを宿主細胞に導入する方法、すなわち形質転換方法も特に限定されるものではなく、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法、マイクロインジェクション法等の従来公知の方法を好適に用いることができる。

## 【0080】

## (5) 本発明にかかる形質転換体

本発明にかかる形質転換体は、上記(1-1)欄で説明した本発明にかかる遺伝子、例えば、上記(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子が導入された形質転換体である。ここで、「遺伝子が導入された」とは、公知の遺伝子工学的手法(遺伝子操作技術)により、対象細胞(宿主細胞)内に発現可能に導入されることを意味する。また、上記「形質転換体」とは、細胞・組織・器官のみならず、生物個体を含む意味である。

## 【0081】

本発明にかかる形質転換体の作製方法(生産方法)は、上述の(4)欄で説明した組換え発現ベクターを形質転換する方法を挙げることができる。また、形質転換の対象となる生物も特に限定されるものではなく、上記宿主細胞で例示した各種微生物や植物を挙げることができる。また、プロモーターやベクターを選択すれば、動物、昆虫も形質転換の対象とすることが可能である。

## 【0082】

また、ここでいう形質転換体には、本発明に係る遺伝子が導入された植物もしくはこれと同じ性質を有する該植物の子孫またはそれらの組織も含まれる。

## 【0083】

## (6) 本発明にかかる遺伝子検出器具

本発明にかかる遺伝子検出器具は、本発明にかかる遺伝子における少なくとも一部の塩基配列またはその相補配列をプローブとして用いたものである。遺伝子検出器具は、種々の条件下において、本発明にかかる遺伝子の発現パターンの検出・測定などに利用することができる。

## 【0084】

本発明にかかる遺伝子検出器具としては、例えば、本発明の遺伝子と特異的にハイブリダイズする上記プローブを基盤(担体)上に固定化したDNAチップが挙げられる。ここで「DNAチップ」とは、主として、合成したオリゴヌクレオチドをプローブに用いる合成型DNAチップを意味するが、PCR産物などのcDNAをプローブに用いる貼り付け型DNAマイクロアレイをも包含するものとする。

## 【0085】

プローブとして用いる配列は、cDNA配列の中から特徴的な配列を特定する従来公知の方法によって決定することができる。具体的には、例えば、SAGE: Serial Analysis of Gene Expression法(Science 276:1268, 1997; Cell 88:243, 1997; Science 270:484, 1995; Nature 389:300, 1997; 米国特許第5,695,937号)等を挙げることができる。

## 【0086】

なお、DNAチップの製造には、公知の方法を採用すればよい。例えば、オリゴヌクレオチドとして合成オリゴヌクレオチドを使用する場合には、フォトリソグラフィー技術と固相法DNA合成技術との組み合わせにより、基盤上で該オリゴヌクレオチドを合成すればよい。一方、オリゴヌクレオチドとしてcDNAを用いる場合には、アレイ機を用いて基盤上に貼り付ければよい。

## 【0087】

また、一般的なDNAチップと同様、パーフェクトマッチプローブ(オリゴヌクレオチド)と、該パーフェクトマッチプローブにおいて一塩基置換されたミスマッチプローブとを配置して遺伝子の検出精度をより向上させてもよい。さらに、異なる遺伝子を並行して検出するために、複数種のオリゴヌクレオチドを同一の基盤上に固定してDNAチップを構成してもよい。

## 【0088】

## (7) 本発明にかかる遺伝子およびタンパク質等の利用方法 (有用性)

ここまでは主にゴマのピペリトールおよびセサミン生合成酵素について述べてきたが、本発明はゴマ由来遺伝子のみに限定されるものではなく、ピペリトールおよびセサミン生合成酵素の利用に関するものである。ピペリトールおよびセサミン生合成酵素の起源としては、植物でも動物でも微生物であってもよく、ピペリトールおよびセサミン生合成酵素活性を有していれば同様にリグナン量制御へ利用できる。さらに本発明はピペリトールおよびセサミン生合成酵素遺伝子を導入することにより、リグナン量が調節された植物もしくはその子孫又はこれらの組織に関するものであり、その形態は切り花であってもよい。本発明で得たピペリトールおよびセサミン生合成酵素遺伝子を用いると、ピペリトールまたはセサミンを生成したり、ピペリトールまたはセサミン生成を抑制したりできる。現在の技術水準をもってすれば、植物に遺伝子を導入し、その遺伝子を構成的あるいは組織特異的に発現させることは可能であるし、またアンチセンス法、コサプレッション法および RNAi 法などによって目的の遺伝子の発現を抑制することも可能である。形質転換可能な植物の例としては、ゴマ、イネ、レンギョウ、タバコ、シロイヌナズナ、ミヤコグサ、オオムギ、小麦、ナタネ、ポテト、トマト、ポプラ、バナナ、ユーカリ、サツマイモ、ダイズ、アルファルファ、ルーピン、トウモロコシ、カリフラワー、バラ、キク、カーネーション、金魚草、シクラメン、ラン、トルコギキョウ、フリージア、ガーベラ、グラジオラス、カスミソウ、カランコエ、ユリ、ペラルゴニウム、ゼラニウム、ペチュニア、トレニア、チューリップ、などがあげられるがこれらに限定されるものではない。

## 【0089】

また、上記(5)に記載の形質転換体を培養し、又は生育させ、該形質転換体からピペリトール及び／又はセサミンを生合成する反応を触媒する活性を有するタンパク質を採取する工程を含むタンパク質の生産方法として利用することができる。上記の方法によれば、ピペリトールまたはセサミンを生合成する反応を触媒する活性を有するタンパク質を簡便かつ大量に生産することができる。なお、本方法は、上記の工程を含んでいればよく、その他具体的な条件、例えば、宿主の種類、使用する材料、条件などは特に限定されるものではなく、適宜設定可能である。

## 【0090】

また、本発明に係る遺伝子または本発明に係るタンパク質は、ピペリトールまたはセサミンを生合成する、ピペリトールまたはセサミンの生産方法にも利用することができる。上記の方法によれば、ピペリトールまたはセサミンを簡便かつ大量に生産することができる。ピペリトールまたはセサミンを含有する食品、特に健康食品、または医薬品などの製造に利用することができる。なお、「遺伝子またはタンパク質を用いて」とは、*in vivo*、*in vitro*、*ex vivo*など種々の条件で遺伝子またはタンパク質を用いる場合が含まれる。例えば、上記遺伝子を植物細胞に導入し、当該形質転換植物の生体内でピペリトールまたはセサミンを生合成させる場合や、生体外において本発明に係るタンパク質とピペリトールまたはセサミンの前駆体とを反応させて、ピペリトールまたはセサミンを生合成する場合、またはバイオリアクターなどを用いてピペリトールまたはセサミンを生産する場合などが挙げられる。なお、遺伝子はそのまま使用しても生合成酵素活性を有しないため、一旦、当該遺伝子がコードするタンパク質を発現させて使用することが好ましい。

## 【0091】

また、本発明に係る遺伝子を用いることにより、リグナン高含有の形質転換体、あるいはリグナン低含有の形質転換体を生産する方法も本発明に含まれる。これによれば、簡便かつ容易にリグナンの含有量を調節した形質転換体を生産でき、形質転換体からリグナンを取り出したり、または形質転換体そのままを食品、医薬品、またはこれらの前駆物質などとして利用することができる。

## 【0092】

また、本発明でいう「ピペリトール・セサミン高含有の植物体」とは、ピペリトール及び／又はセサミンの含有量が多い植物体のことをいい、「ピペリトール・セサミン低含有の植物体」とは、ピペリトール及び／又はセサミンの含有量が少ない植物体のことをいう



## 【0093】

また、本発明に係る遺伝子は、ゴマを育種する方法にも利用可能である。この方法によれば、例えば、本発明に係る遺伝子を導入して、多くのピペリトールまたはセサミンを含むゴマを育種することができる。したがって、かかる形質転換ゴマの種子から、ピペリトールまたはセサミンを多く含む脂質を採取することができる。

## 【0094】

以下添付した図面に沿って実施例を示し、本発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。もちろん、本発明は以下の実施例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることはいうまでもない。さらに、本発明は上述した実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、それぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。

## 【実施例】

## 【0095】

以下実施例に従って、発明の詳細を述べる。分子生物学的手法はとくに断らない限り、Molecular Cloning (Sambrook) に依った。

## 【0096】

〔実施例1：レンギョウからリグナンの調整〕

レンギョウ乾燥葉 60 g を 3 L の水に浸して 30 分間煮沸し、抽出液をろ紙(circle; 300mm 東京ろし会社)にてろ過した。ろ過液を小分けし、エバポレーターで溶媒の体積を減らした後に凍結乾燥(30/N)し、最終的に熱水抽出凍結乾燥物(21.6837 g)を得た。

## 【0097】

上記熱水抽出凍結乾燥物 7 g を 100 ml の水に再溶解させ、超音波により均一化した。ダイアイオン HP-20 樹脂(三菱化学)を 400 ml 充填したカラムを 50% アセトン 800 ml で洗浄後、2 L の水で平衡化した。上記均一化したサンプルを、このカラムを用いて粗精製した。具体的には、カラムに上記サンプルを負荷した後、800 ml の水で洗浄し、次に 50% メタノール 800 ml で一次溶出、引き続き 100% メタノール 800 ml で二次溶出した。

## 【0098】

上記一次および二次溶出サンプルを以下の条件で HPLC 解析を行い、リグナン類の存在を確認した。移動相は、A 液: 0.1% トリフルオロ酢酸(TFA)を 0.1% 含む H<sub>2</sub>O、B 液: 0.1% TFA、90% アセトニトリル、カラムは Develosil C30-UG-5(野村化学、4.6 mm × 150 mm)を用いた。A 60%、B 40% の混合液で 20 分間カラムを平衡化した後、15 分間にわたる流速 0.6 ml/分、A 60%、B 40% → A 10%、B 90% の直線濃度勾配で溶出し、A 10%、B 90% で 10 分間溶出した。検出は 287 nm の吸収を測定することにより行った(粗分取分析)。SPD-10AV(島津製作所)により、220 nm から 400 nm までスペクトルを測定し、その分析結果からリグナン特有の 2 つの吸収極大(230 nm 及び 280 nm)を持つ物質を探索した。その結果、リグナン類と思われる吸収極大を持つ物質は、主に二次溶出液内に含まれていることが明らかとなった。

## 【0099】

次に本分取として、リグナン類を分離するために以下の条件で分取を行った。二次溶出液をエバポレーターで濃縮後、凍結乾燥した(乾燥重量 1.0325 g)。凍結乾燥抽出物 1 g は、1 ml のジメチルスルフォキシド(DMSO)に超音波で溶解させて、6 ml の B 30% 溶液に超音波で溶解し、1,500 rpm で遠心分離後、その上清約 6 ml を負荷した。移動相は、A 液: 0.05% TFA、B 液: 0.05% TFA、90% アセトニトリルとした。カラムは Develosil ODS-UG-15/30; C-18(野村化学、50 mm × 500 mm)を用いて、流速 32 ml/分、A 70%、B 30% で 20 分平衡化後にサンプルを負荷し

、A 70%、B 30%からA 10%、B 90%の直線濃度勾配で60分間溶出後、A 10%、B 90%で30分間溶出を継続した。検出は280 nmの波長で行い、1分ごとに溶出液を分取した(32 ml) (検出器: 115 UV detector, Gilson社)。最終的に280 nmに吸収を持つピークを8種得た。得られた8種についてはエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥後、上記粗分取分析と同様に上記粗分取分析と同様のHPLC条件で分析した。この8種のリグナン特有の吸収スペクトルを示す画分のうち、単一のリグナンと思われるフラクションに関しては<sup>1</sup>H NMR解析を行い、ピノレジノールを同定した。最終的に49.7 mgのピノレジノールが得られた。

#### 【0100】

##### 〔実施例2：ゴマ種子のリグナン分析〕

栽培されているゴマのさやから未熟なゴマ種子を回収して凍結乾燥し、アセトンによりリグナン成分を抽出した。アセトン抽出液の調整方法については以下の通りである。

#### 【0101】

ゴマ種子の凍結乾燥物を粉碎し、そのうち約100 mgを1 mlのアセトンに溶解し、アセトン抽出液を得た。該アセトン抽出液100  $\mu$  lを乾燥させたのち、20  $\mu$  l DM SOに再度溶解し、80  $\mu$  lの0.1% TFAを含む50%アセトニトリルを加えた。次にその溶液をMillex-LHフィルター(ミリポア社、0.45  $\mu$  m/4 mm)にてろ過し、HPLC分析用のサンプルとした。上記サンプルのHPLC分析を行った結果、標品のゴマリグナンであるピペリトール(保持時間約12分)、セサミン(保持時間約16分)およびセサモリン(保持時間約18分)と保持時間の一致するリグナンの存在を確認した。

#### 【0102】

さらにゴマ種子を若い順に成長段階に沿って4ステージに分けた。種子鞘が1.5 cm以下のものをステージ1、1.5~2 cmのものをステージ2、2 cm以上で鞘色が黄緑色のものをステージ3、2 cm以上で鞘色が濃緑色に変化しているものをステージ4とした。これらを上記のHPLC条件で同様に分析したところ、ピペリトール、セサミンおよびセサモリンはステージ3およびステージ4で蓄積が確認された。

#### 【0103】

以上の結果から、HPLC分析に供したゴマ品種においてピペリトールおよびセサミンを生成する酵素および、それをコードする遺伝子が存在することが示された。

#### 【0104】

##### 〔実施例3：ゴマcDNAライブラリーの作製〕

上記のリグナン類を確認したゴマの種子からRNeasy Plant Mini Kit (キアゲン社)により製造業者が推奨する方法に倣ってトータルRNAを抽出し、引き続いてオリゴテックス-MAG mRNA精製キット(TaKaRa)によりポリA(+)RNA 5  $\mu$  gを得た。このポリA(+)RNAを鋳型とし、ZAP Express cDNA Synthesis Kit and ZAP Express cDNA Gigapack3 Gold Cloning Kit (ストラタジーン社)を用いて、ストラタジーン社の推奨する方法によりcDNAライブラリーを作製した。作製したライブラリーは $1 \times 10^7$  p f u / mlであった。

#### 【0105】

##### 〔実施例4：ゴマ由来チトクロームP450遺伝子群のスクリーニング〕

上記cDNAライブラリー約30万p f uから、ゲノム配列が明らかとなっているシロイヌナズナのチトクロームP450遺伝子の配列をプローブとしてスクリーニングを行った。

#### 【0106】

具体的には、シロイヌナズナチトクロームP450遺伝子群の一次配列を基に系統分類し(図3を参照)、CYP90A、CYP72B、CYP71B、CYP84A、CYP96A、CYP710A、CYP86A、CYP74、CYP75B、CYP79F、CYP81D、CYP705A、CYP83Aからなる13種のシロイヌナズナチトクロームP450遺伝子をゴマ種子ライブラリーのスクリーニングプローブとして用いた。配列番号5~30のプライマーを用いてプローブ増幅を行い、プローブのDIG標識を導入した。PCR反応条件は以下のとおりである。シロイヌナズナからRNeasy Plant Mini Ki

t (キアゲン社) を用いて total RNA を抽出した後、total RNA 1  $\mu$ g を鋳型として逆転写反応を行い、cDNA を得た。cDNA 合成は SuperScript<sup>TM</sup> First-Strand Synthesis System for RT-PCR (インヴィトロジェン社) を利用し、合成条件は本システム製造業者が推奨する条件に倣った。PCR 反応液 (50  $\mu$ l) は、各 cDNA 1  $\mu$ l、1 $\times$ Taq buffer (T a K a R a)、0.2 mM dNTPs、プライマー (配列番号 5~30) 各 0.4 pmol/ $\mu$ l、rTaq polymerase 2.5 U からなる。反応は、94 $^{\circ}$ C で 5 分反応させた後、94 $^{\circ}$ C で 1 分、53 $^{\circ}$ C で 1 分、72 $^{\circ}$ C で 2 分の反応を 28 サイクル行った。プローブの DIG 標識を導入する際にも同 PCR 条件で行った。スクリーニングならびに陽性クローンの検出は、DIG-DNA ラベリング & デテクションキット (ロシュ社) を用いた。

#### 【0107】

同社が推奨する方法を基本とし、下記のような低ストリンジェントな条件で行った。すなわち、ハイブリダイゼーションバッファー (5 $\times$ SSC、30%ホルムアミド、50 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.0)、1% SDS、2% ブロッキング試薬 (ロシュ社)、0.1% ラウロイルサルコシン、80 g/ml サケ精子 DNA) を用い、37 $^{\circ}$ C で 2 時間プレハイブリダイゼーションを行った後、DIG 標識したプローブを加え、さらに一晩保持した。メンブレンは 1% SDS を含む 5 $\times$ SSC 洗浄液中、58 $^{\circ}$ C で 1 時間洗浄した。

#### 【0108】

二次スクリーニング後、独立した 96 個の陽性クローンが得られた。引き続き cDNA ライブラリー合成キット製造業者が推奨する方法で 96 個のファージを pBKC-MV プラスミド (ストラタジーン社) へ切り出し、インサート領域の 5' 末端および 3' 末端の塩基配列を M13RV および M13M4 (-20) プライマーにより決定したところ、46 クローンがチトクローム P450 様配列を有していた。インサート領域の全塩基配列を決定し、最終的に SiP168、SiP189、SiP236、SiP249、SiP288 の独立した 5 種類の P450 ホモログに分類された。次にゴマの葉および種子から調整した RNA を逆転写して得られる cDNA を鋳型にこれら 5 種の SiP 遺伝子に特異的なプライマー (配列番号 31~40) により RT-PCR を行い、種子で発現することを確認した。なお RT-PCR は、PCR 反応液 (25  $\mu$ l) は、各 cDNA 1  $\mu$ l、1 $\times$ Ex-Taq buffer (T a K a R a)、0.2 mM dNTPs、プライマー各 0.2 pmol/ $\mu$ l、Ex-Taq polymerase 1.25 U からなる。反応は、94 $^{\circ}$ C で 3 分反応させた後、94 $^{\circ}$ C で 1 分、53 $^{\circ}$ C で 1 分、72 $^{\circ}$ C で 2 分の反応を 26 サイクル行った。なお、発現量を比較するためにゴマ内部標準遺伝子として Ribosomal 18S RNA (AJ236041) を採用した (プライマー: 配列番号 3 および 4)。

#### 【0109】

これら 5 種の SiP 遺伝子のうち、SiP249 (pSPB2031) および SiP288 (pSPB2034) についてはすべての翻訳領域を含むと考えられた (配列番号 53~56)。pSPB2031 については BamHI と XhoI で消化し得られた cDNA を含む約 1.8 kb DNA 断片を、酵母発現ベクター pYE22m (Holton, T. A et al., Nature 366, 276-279, 1993) を BamHI と SalI で消化し得られた約 8.3 kb の DNA 断片に連結し、pSPB2046 を得た。酵母発現ベクター pYE22m のマルチクローニングサイトは glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 遺伝子 (GAPDH) プロモーターと GAPDH ターミネーターに挟まれており、ここに挿入されたインサートは酵母内において GAPDH プロモーターの制御下で構成的に発現する。なお、選抜マーカーはトリプトファンである。一方、pSPB2034 については BamHI と XhoI で消化し得られた cDNA を含む約 1.8 kb DNA 断片を、酵母発現ベクター pYE22m を BamHI と SalI で消化し得られた約 8.3 kb の DNA 断片に連結し、pSPB2047 を得た。引き続き、これらを常法により酵母 INVsc 株 (インヴィトロジェン社) へ形質転換し、それぞれ INVsc/pYE22m/SiP249 および INVsc/pYE22m/SiP288 を得た。

## 【0110】

一方、SiP168、189、236についてはオープンリーディングフレームが不完全であったので、GeneRacerキット（インヴィトロジェン社）を用いて5'領域を製造業者の推奨する方法に従い増幅し、完全なオープンリーディングフレームを含む配列を得た（配列番号1～2、57～60）。増幅用プライマーは配列番号41～46を用いた。

## 【0111】

次に3種のSiP遺伝子の完全長オープンリーディングフレームをクローン化するために、以下の制限酵素サイトを付加したプライマーによりゴマ種子由来cDNAを鋳型にPCRにより増幅した。なおPCR条件は次のとおりである。PCR反応液（50 $\mu$ l）は、鋳型ゴマ種子由来cDNA 1 $\mu$ l、1 $\times$ KOD plus buffer（TOYOBO）、0.2 mM dNTPs、プライマー（配列番号47～52）各0.4 pmol/ $\mu$ l、1 mM MgSO<sub>4</sub>、KOD plus DNA polymerase 1 Uからなる。反応は、94 $^{\circ}$ Cで5分反応させた後、94 $^{\circ}$ Cで1分、55 $^{\circ}$ Cで1分、72 $^{\circ}$ Cで2分の反応を30サイクル行った。増幅された完全長SiPを含む断片をpCR-blunt II TOP0ベクター（インヴィトロジェン社）のマルチクロニングサイトに挿入し、TOP0-SiP168(pSPB2064)、TOP0-SiP189(pSPB2055)、TOP0-SiP236(pSPB2048)を得た。

## 【0112】

pSPB2064、pSPB2055、pSPB2048を増幅したプライマーに付加した制限酵素サイトで消化して得られる約1.5 kbのcDNAを含むDNA断片と、pYE22mベクターをBamHIとSalIで消化して得られるDNA断片約8.3 kbを連結することにより、pYE22m/SiP168(pSPB2052)、pYE22m/SiP189(pSPB2053)、pYE22m/SiP236(pSPB2049)を得た。

## 【0113】

引き続き、これら3種の酵母発現ベクターを酵母INVsc株（インヴィトロジェン社）に形質転換し、INVsc/pYE22m/SiP168、INVsc/pYE22m/SiP189、INVsc/pYE22m/SiP236を得た。

## 【0114】

前述のINVsc/pYE22m/SiP249、INVsc/pYE22m/SiP288に加え、INVsc/pYE22m/SiP168、INVsc/pYE22m/SiP189、INVsc/pYE22m/SiP236を以下に組成示すYNBDg1c培地400 mL（0.67 % Yeast Nitrogen Base、2 % Glucose、20 mg/Lのトリプトファンを除く各種アミノ酸）で30 $^{\circ}$ C、36時間培養した。公知の方法（Holton, T. A et al., Nature 366, 276-279. 1993）に従って形質転換酵母培養液から超遠心分離法でミクロソーム画分を回収した。

## 【0115】

ミクロソーム沈殿をサスペンション緩衝液（0.1 Mリン酸カリウム緩衝液 pH 7.4、20 % グリセロール、0.3  $\mu$ l/mlメルカプトエタノール）1 mlに懸濁し、ミクロソーム溶液を得た。ミクロソーム溶液240  $\mu$ lに1 Mリン酸カリウム緩衝液（pH 7.4）を30  $\mu$ l、50 mM NADPHを6  $\mu$ l、267  $\mu$ Mピノレジノールまたはピペリトールを24  $\mu$ l加え、30 $^{\circ}$ Cで1時間保持した。この酵素反応液に等量の100 % アセトニトリルを加え、終濃度50 % アセトニトリル溶液とした。次に、この溶液を遠心（15000 rpm、3分、4 $^{\circ}$ C）し、その上清150  $\mu$ lをMillex-LHフィルター（ミリポア社、0.45  $\mu$ m/4 mm）にて精製し、実施例1の粗分取分析と同様のHPLC条件で分析を行った。

## 【0116】

以下にINVsc/pYE22m/SiP189について行ったHPLC分析の結果を示す。図2（a）ではピノレジノール（保持時間約8分）であったものが、図2（b）において示したようにINVsc/pYE22m/SiP189により、保持時間約12分と約16分の新たなリグナン様の吸収スペクトルを有する生成物が生じた。さらに図2（

d) でピペリトール (保持時間約12分) であったものが、図2 (e) では上記 INV s c / p Y E 2 2 m / S i P 1 8 9 により保持時間約16分の新たなリグナン様の吸収スペクトルを有する生成物が生じることがわかった。これらは保持時間からそれぞれピペリトール (保持時間約12分) とセサミン (保持時間約16分) であると考えられた。

#### 【0117】

引き続き、LC-MS/MS分析 (LCはWaters 2790, ウォーターズ社、MSはQUATR 0 micro, マイクロマス社) により二つのピーク (保持時間約12分と約16分) の分子量とフラグメントパターンを比較したところ、分子量標準品と一致したため、S i P 1 8 9 による二つの生成物はピペリトールおよびセサミンであることが証明された。LC-MS/MS解析条件は次の通りである。LC条件はDevelosil C30-UG-5 (野村化学、2.0 × 50 mm) を用い、移動相はA液をH<sub>2</sub>O、B液をメタノール、C液を10 mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>とし、グラジエントは常時10% C液で、流速0.25 ml/min. で行った。この条件でピペリトールは8.4分、セサミンは10.1分に検出される。MS条件は測定モードPOSITIVEで行った。これにより、S i P 1 8 9 はピノレジノールからピペリトールを経てセサミンを合成する反応を触媒する酵素をコードすることが明らかになった。また、ピノレジノールからピペリトール、ピペリトールからセサミンを合成する反応は別の酵素が触媒するとされていたが、ここで得た遺伝子がコードする酵素は単一の酵素で両方の反応を触媒することがわかった。

#### 【0118】

また、上記酵素反応液からNADPHを加えない反応系の解析から、INV s c / p Y E 2 2 m / S i P 1 8 9 のピペリトール生成活性はNADPH依存的であることがわかった (図2 (b)・(c))。これはセサミン生成活性についても同様であった (図2 (e)・(f))。また、NADPH存在する場合と比べ、NADPHが存在しない場合ではピペリトール生成活性およびセサミン生成活性はそれぞれ約14%と約18%に減少した。

#### 【0119】

次にINV s c / p Y E 2 2 m / S i P 1 8 9 のミクロソーム画分を一酸化炭素により還元した後、吸収スペクトルを分光光度計 (日立U-3000P Spectrophotometer) で測定したところ、コントロール形質転換酵母であるINV s c / p Y E 2 2 mと比較し、450 nmの吸収を示した。このことからINV s c / p Y E 2 2 m / S i P 1 8 9 のミクロソーム画分内においてチトクロームP450タンパク質が生成されていることを確認した。

#### 【0120】

実施例2で生長段階別に4ステージに分離したゴマ種子から、実施例4と同様の方法でRNAを抽出し、S i P 1 8 9を増幅する配列番号49と50のプライマーセットおよびS i 1 8 S r RNAを増幅する配列番号3および4のプライマーセットによりRT-PCRを行った。PCR反応液 (25 μl) は、各cDNA 1 μl、1 × Ex-Taq buffer (T a K a R a)、0.2 mM dNTPs、プライマー各0.2 pmol/μl、Ex-Taq polymerase 1.25 Uからなる。反応は、94℃で3分反応させた後、94℃で1分、53℃で1分、72℃で2分の反応を26サイクル行った。その結果、種子におけるセサミンの蓄積が顕著化してくる種子ステージ4においてS i P 1 8 9が強く発現することが確認された。生長段階に依存したリグナン蓄積と、その生成活性のあるS i P 1 8 9の遺伝子発現時期が一致することから、ゴマ種子内でピペリトールおよびセサミンを生成する酵素遺伝子がS i P 1 8 9であることが強く支持された。

#### 【0121】

以上の結果から、S i P 1 8 9遺伝子はピノレジノールからピペリトールおよびピペリトールからセサミンを生成する反応を触媒するチトクロームP450をコードすることが明らかとなった。図3の矢印に示したのはS i P 1 8 9である。ここからS i P 1 8 9はCYP81ファミリーに属していることがわかる。

#### 【0122】

本遺伝子を利用することでゴマあるいは他の植物や生物を用いて、あるいはバイオリア

クターなどの系を用いてセサミンとピペリトールを合成することが可能になった。

#### 【0123】

〔実施例5：栽培種ゴマ*Sesamum indicum*における*SiP189*遺伝子のゲノミック解析〕

*S. indicum*から単離したピペリトールおよびセサミンを生成する活性を有する酵素をコードする*SiP189*遺伝子の*S. indicum*ゲノム内でのコピー数を明らかにするためにゲノミックサザン解析を行った。

#### 【0124】

*S. indicum*の葉（真瀬金品種）からNucleon Phytopure for Plant Extraction Kit（アマシャム社）を用いて製造業者が推奨する方法に従ってゲノミックDNAを抽出した。抽出したゲノミックDNA  $10 \mu\text{g}$ をそれぞれEcoRI、NcoI、XbaIの3種の制限酵素で完全消化し、アガロースゲル電気泳動にてゲノミックDNAを分離した。アガロースゲルを0.25M HClで15分間加水分解し、その後1.5M NaClと0.5M NaOHを含む液で30分間変性させ、1.5M NaClとTris-HCl（pH7.5）を含む溶液で中和した。その後、 $20\times\text{SSC}$ でメンブレン（Hybribond-N、アマシャム社）にゲノミックDNAを転写した。メンブレンに転写したゲノミックDNAはUV照射によりメンブレンに結合した。このメンブレンを7% SDS、50%ホルムアミド、 $5\times\text{SSC}$ 、2%ブロッキングリジェント、0.1%ラウロイルサルコシン、50mMリン酸ナトリウムバッファー（pH7.0）のハイブリダイゼーションバッファー（高SDSバッファー、ロシュ社）で42℃、1時間プレハイブリダイゼーションを行った。

#### 【0125】

ハイブリダイゼーションプローブには*SiP189*のcDNAの開始メチオニンから約900bpのORF領域を用いた。この領域を配列番号61（Bam-SST-FW2）と配列番号62（SiP189-Nco-RV）のプライマーを用いてPCRによりDIG標識を入れた。PCR反応は*SiP189*のcDNAを含むプラスミド（pSPB2055）を1ng、 $1\times\text{PCR}$ バッファー、2.5mM DIG-dNTP mixture（PCR DIG Labeling Mix、ロシュ社）、0.2pmol/ $\mu\text{l}$ 各プライマー、rTaq polymerase 1U（タカラバイオ社）からなる。反応条件は、95℃で30秒、53℃で30秒、72℃で1分の反応を30サイクル行った。

#### 【0126】

PCR産物をセファデックスG-50クイックスピンカラム（ベーリンガー社）で精製し、これをハイブリダイゼーションプローブとし、熱変成後、プレハイブリダイゼーション液に $10 \mu\text{l}$ 加えた。42℃で一晩保持した。

#### 【0127】

メンブレンの洗浄は $0.2\times\text{SSC}$ に0.1% SDSを含む溶液で65℃、30分を2回行った（高ストリンジェントな条件）。ハイブリダイゼーションシグナルの検出はDIG-ラベリング&デテクションキット（ロシュ社）を用い、DIGアプリケーションマニュアル（ロシュ社）に従った。

#### 【0128】

図5に検出結果を示す。結果から、上記3種の制限酵素処理区において、すべて単一のバンドとして*SiP189*遺伝子が検出された。この結果から、*S. indicum*ゲノム内に*SiP189*は単一の遺伝子として存在し、*SiP189*と相同性の高い遺伝子が存在しないことが示唆された。すなわち、ゴマ植物内においてピペリトールおよびセサミンを生成する活性は*SiP189*によるものである可能性が高いと考えられる。

#### 【0129】

〔実施例6：アフリカゴマ*Sesamum radiatum*からの*SiP189*様遺伝子の単離〕

アフリカゴマ*Sesamum radiatum*はアフリカに現存するゴマ植物であり、細胞遺伝学解析によれば染色体数は $2n=34$ であり、*S. indicum*（ $2n=26$ ）とは遺伝的に異なる系統である（参考文献、並木満夫、小林貞作「ゴマの科学」朝倉書店）。しかし*S. radiatu*

m種子においてもリグナン含量における解析が報告されており、セサミンが蓄積していることが明らかとなっている(参考文献、Bedigian, D., et al. Biochemical Systematics and Ecology 13, 133-139. 1985)。したがって*S. radiatum*のゲノムには*S. indicum*の*S i P 1 8 9*に対応する酵素およびそれをコードする遺伝子(*S r S i P 1 8 9*)が含まれていることが期待される。また*S r S i P 1 8 9*は*S i P 1 8 9*と配列相同性の高い遺伝子であることが期待される。

#### 【0130】

*S. radiatum*の種子から実施例4と同様にcDNAを調整した。このcDNA 1 $\mu$ lを鋳型に、以下に示すプライマー(配列番号61(Bam-SST-FW2)と63(GR-SST-RV1))を用いて、実施例4と同様の方法でRT-PCR反応を行った。本プライマーは*S i P 1 8 9*の配列を基に完全長ORFを含む断片を増幅するように設計した。その結果、*S r S i P 1 8 9*を含むと思われる約1.5kbの増幅断片が得られたため、これをpCR-blunt II TOPOベクター(インヴィトロジェン社)へ組み込み、pSPB2068を得た。組み込まれた約1.5kb断片の塩基配列を決定したところ、*S. indicum*由来の*S i P 1 8 9*とDNAレベルで96%の配列同一性、アミノ酸レベルで95%の配列同一性を示した(配列番号64にアミノ酸配列を示し、配列番号65に塩基配列を示す)。実施例4に倣って前述の配列番号61および配列番号63を用いて、*S. radiatum*の種子および葉から調整したcDNAを鋳型にRT-PCRを実施したところ、*S r S i P 1 8 9*の発現は種子で強く発現し、葉においてはほとんど発現していないことが分かった。このRT-PCRによる発現解析から*S r S i P 1 8 9*は種子において機能することが示唆された。

#### 【0131】

[実施例7: アフリカゴマ*Sesamum radiatum*における*S r S i P 1 8 9*遺伝子の機能解析]

*S r S i P 1 8 9*の生化学的機能を明らかにするために、酵母にて組み換え*S r S i P 1 8 9*を発現させ、*S r S i P 1 8 9*のリグナン生合成活性を検定した。まず、pSPB2068を制限酵素BamHIとXhoIで消化し、得られた約1.5kbの完全長*S r S i P 1 8 9*のcDNAを含む断片を酵母発現ベクターpYE22mのBamHIとSalIサイトに挿入し、pSPB2069を得た。形質転換酵母からのマイクロソームの調整およびリグナン生合成活性は実施例4と同様に実施した。図6はHPLC分析による測定結果を示したものである。その結果、*S. indicum*由来の*S i P 1 8 9*と同様に*S r S i P 1 8 9*はNADPH依存的にピノレジノールをピペリトールおよびピペリトールをセサミンへ変換する活性を有していた(図6(a)および図6(b))。NADPHを含まない酵素反応液中においてはピペリトール生成活性が16.9%、セサミン生成活性が8.4%にそれぞれ低下した(図6(c)および図6(d))。このことから*S r S i P 1 8 9*は*S. radiatum*における*S i P 1 8 9*のカウンターパート遺伝子であることが明らかとなった。以上の結果から、種を超えて*S i P 1 8 9*様配列を保有する遺伝子はピノレジノールからピペリトール、およびピペリトールからセサミンへ変換する活性を有する酵素をコードすることが明らかとなった。

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0132】

以上のように、本発明に係るゴマ種子由来の*S i P 1 8 9*遺伝子および*S r S i P 1 8 9*遺伝子はピノレジノールからピペリトールおよびピペリトールからセサミンを生成する反応を触媒するチトクロームP450をコードする遺伝子である。古来から貴重な食品であり、健康に良い食品の代表として知られているゴマの種子、または該種子から得た油、ゴマ種子からの抽出物は今後益々注目されると期待される。その中でもセサミンはその生理活性が注目されている。従って、本発明により同定された*S i P 1 8 9*遺伝子および*S r S i P 1 8 9*遺伝子は、これまでゴマ種子から生産する方法しかなかったセサミンの生産手段に利用することが可能であり、生産量の拡大が大いに期待できる。

#### 【0133】

したがって、本発明は、農業、食品産業、医薬品産業、およびこれらの関連産業に利用



可能である。

【図面の簡単な説明】

【0134】

【図1】ゴマリグナンの一般的な合成経路を模式的に示す図である。

【図2】本発明に係る実施例における S i P 1 8 9 遺伝子がコードする酵素の活性を測定した H P L C の結果を示す図である。

【図3】（チトクローム P 4 5 0 のコードするアミノ酸の一次構造解析から得られる樹系図である。

【図4】本発明に係る S i P 1 8 9 遺伝子がコードするタンパク質との相同性検索の結果を示す図である。

【図5】 S i P 1 8 9 遺伝子のサザン解析の結果を示す図である。

【図6】本発明に係る実施例における S r S i P 1 8 9 遺伝子がコードする酵素の活性を測定した H P L C の結果を示す図である。

【符号の説明】

【0135】

- 1      コニフェリルアルコール
- 2      ピノレジノール
- 3      ピペリトール合成酵素
- 4      ピペリトール
- 5      セサミン合成酵素
- 6      セサミン



## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; SUNTORY LIMITED

&lt;120&gt; The gene related to the biosynthesis of lignan, and the use thereof

&lt;130&gt; p03-0121

&lt;150&gt; JP 2003-341313

&lt;151&gt; 2003-09-30

&lt;160&gt; 65

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 506

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sesamum indicum

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; SiP189

&lt;400&gt; 1

Met	Glu	Ala	Glu	Met	Leu	Tyr	Ser	Ala	Leu	Ala	Leu	Thr	Phe	Ala	Ile
1				5					10					15	

Phe	Met	Val	Tyr	Arg	Ile	Leu	Ser	Asn	Ser	Gln	Asp	Lys	Arg	Ser	Leu
			20					25					30		

Thr	Lys	Leu	Pro	Pro	Ser	Pro	Pro	Gly	Trp	Leu	Pro	Val	Ile	Gly	His
		35					40					45			

Ala	His	Leu	Met	Lys	Asn	Leu	Leu	His	Arg	Thr	Leu	Tyr	Asp	Phe	Ser
	50					55					60				

Gln	Lys	Leu	Gly	Pro	Ile	Phe	Ser	Ile	Arg	Phe	Gly	Ser	Arg	Leu	Val
65					70					75				80	

Val	Val	Val	Ser	Ser	Ser	Ser	Leu	Val	Glu	Glu	Cys	Phe	Thr	Lys	Tyr
			85						90					95	

Asp	Ile	Val	Leu	Ala	Asn	Arg	Pro	Gln	Ala	Ser	Val	Asp	Arg	Arg	Ser
			100					105					110		

Leu	Gly	Phe	Ser	Thr	Thr	Ser	Val	Ile	Gly	Ala	Pro	Tyr	Gly	Asp	His
		115					120					125			

Trp Arg Asn Leu Arg Lys Leu Cys Asp Leu Glu Val Phe Ala Pro Thr  
130 135 140

Arg Leu Ala Ser Phe Leu Ser Ile Arg Leu Asp Glu Arg Asp Arg Met  
145 150 155 160

Ile Ser Ala Leu Tyr Lys Ile Ser Ser Ala Gly Phe Ala Lys Val Asn  
165 170 175

Leu Glu Ala Lys Ile Val Glu Leu Thr Phe Asn Asn Ile Met Arg Met  
180 185 190

Val Ala Ala Lys Arg Tyr Tyr Gly Glu Glu Ala Glu Asp Asp Glu Glu  
195 200 205

Ala Lys Arg Phe Arg Asp Leu Thr Lys Glu Ala Leu Glu Leu Thr Ser  
210 215 220

Ala Ser Asn Pro Gly Glu Ile Phe Pro Ile Leu Arg Trp Leu Gly Cys  
225 230 235 240

Asn Gly Leu Glu Lys Lys Leu Ala Val His Ser Arg Lys Thr Asp Glu  
245 250 255

Phe Met Gln Gly Leu Leu Asp Glu His Arg Arg Gly Glu Arg Gln Asn  
260 265 270

Thr Met Val Asp His Leu Leu Ser Leu Gln Glu Ser Gln Pro Glu Tyr  
275 280 285

Tyr Thr Asp Glu Ile Ile Thr Gly Leu Ile Val Ala Leu Ile Ile Ala  
290 295 300

Gly Thr Asp Ala Ser Val Val Thr Thr Glu Trp Ala Met Ser Leu Leu  
305 310 315 320

Leu Asn His Pro Lys Val Leu Glu Lys Ala Arg Lys Glu Leu Asp Thr  
325 330 335

Leu Val Gly His Glu Arg Met Val Asp Glu His Asp Leu Pro Lys Leu  
340 345 350

Arg Tyr Leu His Cys Ile Val Leu Glu Thr Leu Arg Leu Phe Pro Ser  
355 360 365

Val Pro Thr Leu Val Pro His Glu Pro Ser Glu Asp Cys Lys Ile Gly  
370 375 380

Gly Tyr Asn Val Pro Lys Gly Thr Met Val Leu Val Asn Ala Trp Ala  
385 390 395 400

Ile His Arg Asp Pro Lys Val Trp Asp Asp Pro Leu Ser Phe Lys Pro  
405 410 415

Asp Arg Phe Glu Ile Met Glu Val Glu Thr His Lys Leu Leu Pro Phe  
420 425 430

Gly Met Gly Arg Arg Ala Cys Pro Gly Ala Gly Leu Ala Gln Lys Phe  
435 440 445

Val Gly Leu Ala Leu Gly Ser Leu Ile Gln Cys Phe Asp Trp Glu Arg  
450 455 460

Thr Ser Pro Glu Lys Ile Asp Leu Asn Glu Gly Ser Gly Ile Thr Leu  
465 470 475 480

Pro Lys Ala Lys Thr Leu Glu Ala Met Cys Lys Pro Arg His Val Met  
485 490 495

Glu Lys Val Leu Arg Gln Val Ser Asn Val  
500 505

<210> 2

<211> 1518

<212> DNA

<213> Sesamum indicum

<220>

<223> SiP189

<400> 2

```

atggaagctg aaatgctata ttcagctctc gctctcacct tcgccatatt catggtttac 60
agaattcttt ctaattcgca ggacaagcgc agcctgacta agctgcctcc gagcccgccc 120
ggttggctgc cgggtgatcgg ccacgctcat ctcattgaaa atctcctcca tagaacacta 180
tacgacttct cccagaaact gggacccata ttttccatcc ggttcgggtc gcgcctcgtg 240
gtggtggtgt cctcctctc cctggtggag gaatgtttca ccaagtatga cattgtcttg 300
gcaaattcgcc ctcaggcttc tgttgaccgg cgctcacttg ggttcagcac caccagcgta 360
atcggggccc cgtacgggga ccattggcgc aacctgcgaa agttgtgcga tcttgaagta 420
ttcggcccga cccgtctcgc ctggttttta tccatcaggc ttgacgagag ggaccgcatg 480
atttccgcgt tatacaaaat ctggtccgcc gggttcgcga aggtgaattt ggaagcgaag 540
attgtggagc tgacgtttta taacataatg aggatggtgg cggcgaagag atactatggg 600
gaggaggcgg aggacgacga ggaggcgaag aggttcaggg acctgacgaa ggaggctttg 660
gagttgacga gcgcttccaa tcctgggtgag atatttccaa tattgcggtg gcttgggttg 720
aatgggctgg agaagaagct ggctgttcac tcgcggaaga cggatgagtt catgcaaggg 780
ctgctggacg aacaccgacg gggcgagcgc cagaacacca tggttgatca tttgctttcg 840
ttgcaggaat ctcaacctga gtactacact gatgaaatca tcaactggcct catagttgca 900
ttgataattg cgggaacgga tgcacgggtt gtaactacag aatgggcatg gtccctttta 960
ctaaatcatc ccaaagtact tgaaaaggct agaaaagaac tggacactct agtaggacac 1020
gaacgcatgg ttgatgaaca cgatctcccc aaactacgtt accttactg catagtcttg 1080

```

gagaccttaa gggtattccc ttctgttcca actttggtgc cacacgaacc atcagaggat 1140  
tgtaaaattg ggggatacaa tgtccccaag gggacaatgg tattagtga tgcttgggca 1200  
atacaccgag accccaaggt gtgggacgac cccttgagct ttaagcccga caggtttgag 1260  
ataatggaag tggagacaca caagttgttg ccgttcggaa tgggcaggag agcgtgtcct 1320  
ggagctggac tggcgcagaa gtttgtgggg ttggctttgg ggtcgctgat tcagtgtttc 1380  
gactgggaga gaacgagtcc cgagaaaatt gacttgaacg aaggttctgg gataaccttg 1440  
cctaaagcta agacgttggg agccatgtgc aaacctagac atgtcatgga aaaagttctt 1500  
cgtcaggttt ccaacgtt 1518

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, Sil8SrRNA-FW

<400> 3

tatgcttgtc tcaaagatta a

21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, Sil8SrRNA-RV

<400> 4

aacatctaag ggcatacacag a

21

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, CYP90A-FW

<400> 5

ttttccgatg aagagattgt tgac

24

<210> 6

<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, CYP90A-RV

<400> 6

tgccatctcc aagggttg

18

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, CYP72B-FW

<400> 7

cttaatgttc aaatgataat ggat

24

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, CYP72B-RV

<400> 8

gtaaatacgtt cagggttg

18

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, CYP71B-FW

<400> 9

ttcaccactg atcatctcaa agga

24

<210> 10  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, CYP71B-RV

<400> 10  
agaaacctgt cagggtta 18

<210> 11  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, CYP84A-FW

<400> 11  
cttaccctgtg acaatatcaa agca 24

<210> 12  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, CYP84A-RV

<400> 12  
aaaaacctcg atggtcta 18

<210> 13  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, CYP96A-FW

<400> 13

agtcatagata agttcctcag ggac

24

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, CYP96A-RV

&lt;400&gt; 14

atccatctct ctggcttg

18

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, CYP710A-FW

&lt;400&gt; 15

tccgaagacg aagccatcgg cggt

24

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, CYP710A-RV

&lt;400&gt; 16

ctaaaccggt ccggatcg

18

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, CYP86A-FW

<400> 17  
cgcgtggcgc tcaacttcat ccta 24

<210> 18  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, CYP86A-RV

<400> 18  
atccatctct ctggtttg 18

<210> 19  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, CYP74-FW

<400> 19  
cgagaagaag ctactcaca tctt 24

<210> 20  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, CYP74-RV

<400> 20  
acgaatctct ccggcaca 18

<210> 21  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>



<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, CYP75B-FW

<400> 21

ttaacggata ctgagattaa agcct

25

<210> 22

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, CYP75B-RV

<400> 22

aagaatctct cgggttta

18

<210> 23

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, CYP79F-FW

<400> 23

gtcacaccag acgaaatcaa agct

24

<210> 24

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, CYP79F-RV

<400> 24

aggtgacgct ccggtttg

18

<210> 25

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, CYP81D-FW

&lt;400&gt; 25

tacatggacc gcatcatcaa agga

24

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, CYP81D-RV

&lt;400&gt; 26

tcgaacctct ctggcttg

18

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, CYP705A-FW

&lt;400&gt; 27

catatcaagt cgcttctcac ggta

24

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, CYP705A-RV

&lt;400&gt; 28

agaaacctct ctggttta

18

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 24

<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, CYP83A-FW

<400> 29  
tttactgatg ataatgtcaa agcc

24

<210> 30  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, CYP83A-RV

<400> 30  
agaaacctct cgggccta

18

<210> 31  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, SiP168-FW

<400> 31  
tttcccttgt tctcctactc t

21

<210> 32  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, SiP168-RV

<400> 32  
aaataatgat agctaaattt t

21

<210> 33  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, SiP189-FW

<400> 33  
tcgtttttat ccatcaggct t 21

<210> 34  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, SiP189-RV

<400> 34  
caaacgttgg aaacctgacg a 21

<210> 35  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, SiP236-FW

<400> 35  
ggatgttctg tggaagttaa a 21

<210> 36  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, SiP236-RV

<400> 36  
atctaagttt catgcagttt t 21

<210> 37  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
 Synthesized Primer Sequence, SiP249-FW

<400> 37  
 ctaagcttca aaatgtcgat a 21

<210> 38  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
 Synthesized Primer Sequence, SiP249-RV

<400> 38  
 ccaacttact tattacagat a 21

<210> 39  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
 Synthesized Primer Sequence, SiP288-FW

<400> 39  
 aaaatggtgg gaattgtgta t 21

<210> 40  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
 Synthesized Primer Sequence, SiP288-RV

<400> 40  
tacatctcaa tttttctta

19

<210> 41  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, GR-SiP168-RV

<400> 41  
cacgatcctg gagatttccg gggaggatac aa

32

<210> 42  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, GR-SiP168-Nest-RV

<400> 42  
gtaggttttg gagagttt

18

<210> 43  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, GR-SiP189-RV

<400> 43  
ctcgtcgtcc tccgcctcct ccccatagta t

31

<210> 44  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Artificially

## Synthesized Primer Sequence, GR-SiP189-Nest-RV

&lt;400&gt; 44

accatcctca ttatgttatt a

21

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, GR-SiP236-RV

&lt;400&gt; 45

ccaggagaga gttgttgctg ttgtgtct

28

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, GR-SiP236-Nest-RV

&lt;400&gt; 46

tataaagctt attgttat

18

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, SiP168-BamH1-FW

&lt;400&gt; 47

ggatccaaaa gagcaaatta tggatctact act

33

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, SiP168-XhoI-RV

&lt;400&gt; 48

ctcgagaagg gaaaataatg atagctaaat ttt

33

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, SiP189-BamHI-FW

&lt;400&gt; 49

ggatcctttt cagccaacat ggaagctgaa

30

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, SiP189-XhoI-RV

&lt;400&gt; 50

ctcgagaaaa agagcatcat ttaatcatat act

33

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, SiP236-BamHI-FW

&lt;400&gt; 51

ggatccttca cttcacttca ttgctcaatg gcaaa

35

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, SiP236-XhoI-RV

<400> 52

ctcgagaaca gctgagaccc cacagcaatc taa

33

<210> 53

<211> 1503

<212> DNA

<213> Sesamum indicum

<220>

<223> SiP249

<400> 53

atgtcgatac ctctccttat ctctctctca ttaatcatcc ttgttttcct actagtccga 60  
cgacgccgca acagcccggc tggtcgaaaa ctccggcgctc ctccggggcc tcctggcctt 120  
cccttcctcg ggaacttgct ccaatacaac ccctccgac tccatctccg cctgacaaaa 180  
ctctcagaaa agtacggccc gcttatgtac atgacgttcg tcggaaagcc cgtggttgtg 240  
atttcacatcg cccgagtggc caaagaggct ttgaagtaca atgaccttgc attttcgagc 300  
aggccttcta ccattgcatc gcgcaaagtg gcttacaaca acagtgacat ctccatgtca 360  
ccgtacacag agtactggag agaactgcgg aaaatggctg ttcttcgcct ctttacggtc 420  
aaacaagtga actctttccg ccctgctcga gaagaagaag tggcccgcat ggtgaaagag 480  
atttcagac gggccaacgc gcatcagccc gttaacatta atgaaatagc gttgtcgttg 540  
tcgagcagga tgatatctag gtttgactg ggggaagaggt acgacgagga gaacgggccc 600  
gaaaagagga ggttcgacag gattctgcag ctgcttcagt tgggtgcggt ggaaattttc 660  
tttgggtgatt attctccatg gctgggctgg attgacagac tgtgtggtaa ggtttctcag 720  
cttgagaagg cgttcaagga tttggattca ttgtatgaag agatgatcgc ggagcatctg 780  
agcccgaata ggcccagtc tatgaacgga gacattcttg atatgctaata tcagatgaaa 840  
gaagatcggt cgtcgacggt tcaaattgat tgggatcata tcaagggcgt actcatgaac 900  
atgttcgtag ccggaacaga cacaactgca gctacaataa catgggcaat gacagctctg 960  
atcaagaagc ctcaagtact gaacaaagtg caacaagaaa tcagatctgt ggtcggaaag 1020  
aaaggcagcg tagccgaaga tgatatacaa aaacttcctt attttaaagc ggtggtgaag 1080  
gagactctga gactgtacgc accagctcca ctctcactgc ccagactgac aatcaaaagc 1140  
agcgtcatag atggatacga cattgaacc aacaccatag ttacgtgaa cgtttgggcg 1200  
attagccgag acaaggattt ttgggagaac ccgatgagt tcttgcccga aagattcttg 1260  
aacagtagcg tggactttta aggccaagat ttcgggtttc ttccattcgg gtcggggcga 1320  
agagtgtgcc ctggaatggc cttggggact gcagaagtgg aggtgtcgct tgctaattatt 1380  
ctgtattgct tccactggga attgccgcct ggaatggtag aagatgacgt tgatatggac 1440  
tttttgctg gaattactac tcataagaaa aatgcactct atttgatggc caaaagctat 1500  
ctg 1503

<210> 54

<211> 501

<212> PRT

&lt;213&gt; Sesamum indicum

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; SiP249

&lt;400&gt; 54

Met Ser Ile Pro Leu Leu Ile Ser Leu Ser Leu Ile Ile Leu Val Phe  
 1 5 10 15

Leu Leu Val Arg Arg Arg Arg Asn Ser Pro Ala Gly Arg Lys Leu Arg  
 20 25 30

Arg Pro Pro Gly Pro Pro Gly Leu Pro Phe Leu Gly Asn Leu Leu Gln  
 35 40 45

Tyr Asn Pro Ser Asp Leu His Leu Arg Leu Thr Lys Leu Ser Glu Lys  
 50 55 60

Tyr Gly Pro Leu Met Tyr Met Thr Phe Val Gly Lys Pro Val Val Val  
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Ala Arg Val Ala Lys Glu Ala Leu Lys Tyr Asn Asp Leu  
 85 90 95

Ala Phe Ser Ser Arg Pro Ser Thr Ile Ala Ser Arg Lys Val Ala Tyr  
 100 105 110

Asn Asn Ser Asp Ile Ser Met Ser Pro Tyr Thr Glu Tyr Trp Arg Glu  
 115 120 125

Leu Arg Lys Met Val Val Leu Arg Leu Phe Thr Val Lys Gln Val Asn  
 130 135 140

Ser Phe Arg Pro Ala Arg Glu Glu Glu Val Ala Arg Met Val Lys Glu  
 145 150 155 160

Ile Ser Arg Arg Ala Asn Ala His Gln Pro Val Asn Ile Asn Glu Ile  
 165 170 175

Ala Leu Ser Leu Ser Ser Arg Met Ile Ser Arg Phe Ala Leu Gly Lys  
 180 185 190

Arg Tyr Asp Glu Glu Asn Gly Pro Glu Lys Arg Arg Phe Asp Arg Ile  
 195 200 205

Leu Gln Leu Leu Gln Leu Val Ser Val Glu Ile Phe Phe Gly Asp Tyr  
 210 215 220

Ser Pro Trp Leu Gly Trp Ile Asp Arg Leu Cys Gly Lys Val Ser Gln  
 225 230 235 240

Leu Glu Lys Ala Phe Lys Asp Leu Asp Ser Leu Tyr Glu Glu Met Ile  
245 250 255

Ala Glu His Leu Ser Pro Asn Arg Pro Glu Ser Met Asn Gly Asp Ile  
260 265 270

Leu Asp Met Leu Ile Gln Met Lys Glu Asp Arg Ser Ser Thr Val Gln  
275 280 285

Ile Asp Trp Asp His Ile Lys Gly Val Leu Met Asn Met Phe Val Ala  
290 295 300

Gly Thr Asp Thr Thr Ala Ala Thr Ile Thr Trp Ala Met Thr Ala Leu  
305 310 315 320

Ile Lys Lys Pro Gln Val Leu Asn Lys Val Gln Gln Glu Ile Arg Ser  
325 330 335

Val Val Gly Lys Lys Gly Ser Val Ala Glu Asp Asp Ile Gln Lys Leu  
340 345 350

Pro Tyr Phe Lys Ala Val Val Lys Glu Thr Leu Arg Leu Tyr Ala Pro  
355 360 365

Ala Pro Leu Ser Leu Pro Arg Leu Thr Ile Lys Ser Ser Val Ile Asp  
370 375 380

Gly Tyr Asp Ile Glu Pro Asn Thr Ile Val Tyr Val Asn Val Trp Ala  
385 390 395 400

Ile Ser Arg Asp Lys Asp Phe Trp Glu Asn Pro Asp Glu Phe Leu Pro  
405 410 415

Glu Arg Phe Leu Asn Ser Ser Val Asp Phe Lys Gly Gln Asp Phe Gly  
420 425 430

Phe Leu Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Val Cys Pro Gly Met Ala Leu  
435 440 445

Gly Thr Ala Glu Val Glu Val Ser Leu Ala Asn Ile Leu Tyr Cys Phe  
450 455 460

His Trp Glu Leu Pro Pro Gly Met Val Glu Asp Asp Val Asp Met Asp  
465 470 475 480

Phe Leu Pro Gly Ile Thr Thr His Lys Lys Asn Ala Leu Tyr Leu Met  
485 490 495

Ala Lys Ser Tyr Leu

500

<210> 55  
 <211> 1545  
 <212> DNA  
 <213> Sesamum indicum

<220>  
 <223> SiP288

<400> 55  
 atgggtgggaa ttgtgtatat tgagcttttc ttgtcagtta tgtggtttat ggctttgttg 60  
 gtgtggttga attacagggc cctggcgttg aactggcctg tgatcggaat gctgccgacg 120  
 cttctgcttc acgtgagccg gattcacgac aattgcacgg agattatggg gaagtcccga 180  
 cggggaactt ttcatttccg gggctccctg ttggctgata tggacatgat ggggactgct 240  
 gatcctgaga atgttacta cattatgagc gcgaacttcc agaatttccc gaaaggcccc 300  
 aagttcaggg aaatttttga tgttcttgga gatgggattt tcaatgcaga ttcggagtcc 360  
 tggagggacc agagaagggt tgccagggcc ctgatttctc accatggttt cctccggttt 420  
 ctggcgaaga tcagccgtga gaaggtagag aaaggcctga ttccagtctt tgaaacgggtg 480  
 tgcctggaaa atcgggtggg cgatttgcag gatttgttcc agaggttgac gtttgataca 540  
 acttgtacat ttgttactgg ttatgatcct ggatgcttgt ctgttgattt gcctgatgtt 600  
 cctttctcga aagccctaga tgatgccgaa gaagcgatat tcatgcgcca tgtggttctt 660  
 gaaaagattt ggaaacttca gaggtgggtt ggggttgga ctgagagaaa attgagcaag 720  
 gctcgtgaag tcttggaatg cgtcattggc aggtatatcg cgctgaagcg cggcgaaatg 780  
 agaagccgag gaatttcgat tgattgtgaa aatgaagatg gtgtggatct gctcacgtct 840  
 tacatgactg tgggagacga tgggtactca acccatgatt tgaaatgtga tgacaagtct 900  
 ttgagggaca cgatactgaa tctaattgatt gcagggcggg acacgacgag ttctgctctg 960  
 acatggttta tatggcttgt gtcgacacat gctgaagtgg aaaagaggat cagggatgaa 1020  
 ctgaagtcct ttctgccgcg cggagaacgt gaaaagtggc gtgtgttttg ggttgaagaa 1080  
 accaagaagt tggtttacat gcatggagca atttgcgaag ccctacgact atatccacca 1140  
 gtcccgttcc agcataagga gccggtggaa ccagatatcc ttccgagcgg gcattttgtg 1200  
 gaaccgacaa tgaaagtgat gttctcattg tacgccatgg gacggatgga atccgttttg 1260  
 ggcgaggatt gcttgaatt caagccggag aggtggattt ctgatagggg atcgatcaag 1320  
 cacgagccct catacaagtt cttggctttc aatgctggtc cgaggacttg cttggggaag 1380  
 gatgtggctt tcgctcaggt gaaggcagtg gccgccacct taatccataa ctaccaagtt 1440  
 cacgtggcag acggccaccg cgtgctgcc aattgttcca tcacctcta catgaggaat 1500  
 ggattgaagg ttagggttgc caatagatgg tctgctaaga aaaat 1545

<210> 56  
 <211> 515  
 <212> PRT  
 <213> Sesamum indicum

<220>  
 <223> SiP288

<400> 56  
 Met Val Gly Ile Val Tyr Ile Glu Leu Phe Leu Ser Val Met Trp Phe

1	5	10	15
Met Ala Leu Trp Val Trp Leu Asn Tyr Arg Ala Leu Ala Trp Asn Trp	20	25	30
Pro Val Ile Gly Met Leu Pro Thr Leu Leu Leu His Val Ser Arg Ile	35	40	45
His Asp Asn Cys Thr Glu Ile Met Gly Lys Ser Arg Arg Gly Thr Phe	50	55	60
His Phe Arg Gly Pro Trp Leu Ala Asp Met Asp Met Met Gly Thr Ala	65	70	75
Asp Pro Glu Asn Val His Tyr Ile Met Ser Ala Asn Phe Gln Asn Phe	85	90	95
Pro Lys Gly Pro Lys Phe Arg Glu Ile Phe Asp Val Leu Gly Asp Gly	100	105	110
Ile Phe Asn Ala Asp Ser Glu Ser Trp Arg Asp Gln Arg Arg Val Ala	115	120	125
Arg Ala Leu Ile Ser His His Gly Phe Leu Arg Phe Leu Ala Lys Ile	130	135	140
Ser Arg Glu Lys Val Glu Lys Gly Leu Ile Pro Val Leu Glu Thr Val	145	150	155
Cys Leu Glu Asn Arg Val Val Asp Leu Gln Asp Leu Phe Gln Arg Leu	165	170	175
Thr Phe Asp Thr Thr Cys Thr Phe Val Thr Gly Tyr Asp Pro Gly Cys	180	185	190
Leu Ser Val Asp Leu Pro Asp Val Pro Phe Ser Lys Ala Leu Asp Asp	195	200	205
Ala Glu Glu Ala Ile Phe Met Arg His Val Val Pro Glu Lys Ile Trp	210	215	220
Lys Leu Gln Arg Trp Phe Gly Val Gly Ser Glu Arg Lys Leu Ser Lys	225	230	235
Ala Arg Glu Val Leu Asp Ser Val Ile Gly Arg Tyr Ile Ala Leu Lys	245	250	255
Arg Gly Glu Met Arg Ser Arg Gly Ile Ser Ile Asp Cys Glu Asn Glu	260	265	270

Asp Gly Val Asp Leu Leu Thr Ser Tyr Met Thr Val Gly Asp Asp Gly  
 275 280 285  
 Thr Gln Thr His Asp Leu Lys Cys Asp Asp Lys Phe Leu Arg Asp Thr  
 290 295 300  
 Ile Leu Asn Leu Met Ile Ala Gly Arg Asp Thr Thr Ser Ser Ala Leu  
 305 310 315 320  
 Thr Trp Phe Ile Trp Leu Val Ser Thr His Ala Glu Val Glu Lys Arg  
 325 330 335  
 Ile Arg Asp Glu Leu Lys Ser Phe Leu Pro Ala Gly Glu Arg Glu Lys  
 340 345 350  
 Trp Arg Val Phe Gly Val Glu Glu Thr Lys Lys Leu Val Tyr Met His  
 355 360 365  
 Gly Ala Ile Cys Glu Ala Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Val Pro Phe Gln  
 370 375 380  
 His Lys Glu Pro Val Glu Pro Asp Ile Leu Pro Ser Gly His Phe Val  
 385 390 395 400  
 Glu Pro Thr Met Lys Val Met Phe Ser Leu Tyr Ala Met Gly Arg Met  
 405 410 415  
 Glu Ser Val Trp Gly Glu Asp Cys Leu Glu Phe Lys Pro Glu Arg Trp  
 420 425 430  
 Ile Ser Asp Arg Gly Ser Ile Lys His Glu Pro Ser Tyr Lys Phe Leu  
 435 440 445  
 Ala Phe Asn Ala Gly Pro Arg Thr Cys Leu Gly Lys Asp Val Ala Phe  
 450 455 460  
 Ala Gln Val Lys Ala Val Ala Ala Thr Leu Ile His Asn Tyr Gln Val  
 465 470 475 480  
 His Val Ala Asp Gly His Arg Val Leu Pro Asn Cys Ser Ile Ile Leu  
 485 490 495  
 Tyr Met Arg Asn Gly Leu Lys Val Arg Val Ala Asn Arg Trp Ser Ala  
 500 505 510  
 Lys Lys Asn  
 515

<211> 1494  
 <212> DNA  
 <213> Sesamum indicum

<220>  
 <223> SiP168

<400> 57  
 atggatctac tactttccct tgtttctcta ctctgttctg cagcatgcat ttggtttctc 60  
 cgggtgggtcc tgaaacccaa tccagggccc cggaaatcag ccaatctccc tccagggcca 120  
 aaacctcttc ccataatcgg caacattctt gagcttgggt agaaaccca ccaatctctc 180  
 gccaaactct ccaaaacctt cggggcccctg atgcgtctca agctgggaac catgacaaca 240  
 gttgttgtat cctccccgga aatctccagg atcgtgctgc aacaatatga ccaagttttc 300  
 tccagccgaa cacacgcaga tgccatccga gcacttgacc accacaaaca ttccgtcgcc 360  
 tggataccgg cggacaatca gtggcgga aa atccgtaa ac tgtgcaaaga gaagatgttt 420  
 tcgggcca aa agcttgatgc gaaccagggc ctgaggaggg agaagttgcg taatttgcaa 480  
 gactatgtga atgaatgtg cgttagtggc caggctgtgg atattgggtg agctgccttt 540  
 acgacgaccc ttaatctgat atcggccact cttttctcgg tggattttgc tgattttggg 600  
 tctggttcgt ctcaagagct taaggatgtt atgagcggga tagcgtctat catcgccga 660  
 ccaaattttg ctgattgttt cctctttctt cggctgggtg atccacaggg catcttccgc 720  
 cagaccacgt tacatttcaa caagtgtttt aagatctttg atgaaattat ccgtcaaagg 780  
 ctacagacca atgattcggg gacgaaaagt gacatgctga aagagcttct tgaaatcaac 840  
 cagaaagatg agtctgaatt gagctttgac gagatcaagc atttactcct ggatctactt 900  
 gtcgcaggaa cggacacaac ttacgttaca gtggaatggg caatgacgga gctagtgcgc 960  
 caccctgaga aaatgtcgaa agccagaaat gagttaagaa atgtgggtggg actgaataaa 1020  
 gaaattcaag aatcagacat ctcaagactc cttacctac gagcagtggg gaaagaaagt 1080  
 tttaggcttc accctgcaac tcctttatcg gtacctaca aggccgacga ggaagcagaa 1140  
 atcaatggct atatatgtccc taaaggagca caagttctca tgaacgtgtg ggccatcggc 1200  
 agagattcaa gcatatggag gaaccctgat gtattcatgc ccgagagggt cttggagaca 1260  
 gaaattgatg tccgtggcca acacttcgag ctgcttcctt ttggcggggg gaggaggatt 1320  
 tgcgtggggc tgccgttagc ctatcgtatg atccatctcg tgcttgccac ttcataagc 1380  
 gactatgatt ggaaacttga aggagggctg aaaactgaag aaatggacat gagtgaagaa 1440  
 ttcggcctca cctgcaaaa agccattcct ctcaaggcac ttccagttaa aatt 1494

<210> 58  
 <211> 498  
 <212> PRT  
 <213> Sesamum indicum

<220>  
 <223> SiP168

<400> 58  
 Met Asp Leu Leu Leu Ser Leu Val Leu Leu Leu Cys Ser Ala Ala Cys  
 1 5 10 15  
 Ile Trp Phe Leu Arg Val Val Leu Lys Pro Asn Pro Gly Pro Arg Lys  
 20 25 30

Ser Ala Asn Leu Pro Pro Gly Pro Lys Pro Leu Pro Ile Ile Gly Asn  
           35                          40                          45  
 Ile Leu Glu Leu Gly Glu Lys Pro His Gln Ser Leu Ala Lys Leu Ser  
           50                          55                          60  
 Lys Thr Tyr Gly Pro Leu Met Arg Leu Lys Leu Gly Thr Met Thr Thr  
           65                          70                          75                          80  
 Val Val Val Ser Ser Pro Glu Ile Ser Arg Ile Val Leu Gln Gln Tyr  
                           85                          90                          95  
 Asp Gln Val Phe Ser Ser Arg Thr His Ala Asp Ala Ile Arg Ala Leu  
                           100                          105                          110  
 Asp His His Lys His Ser Val Ala Trp Ile Pro Ala Asp Asn Gln Trp  
           115                          120                          125  
 Arg Lys Ile Arg Lys Leu Cys Lys Glu Lys Met Phe Ser Gly Gln Lys  
           130                          135                          140  
 Leu Asp Ala Asn Gln Gly Leu Arg Arg Glu Lys Leu Arg Asn Leu Gln  
           145                          150                          155                          160  
 Asp Tyr Val Asn Glu Cys Cys Val Ser Gly Gln Val Val Asp Ile Gly  
                           165                          170                          175  
 Val Ala Ala Phe Thr Thr Thr Leu Asn Leu Ile Ser Ala Thr Leu Phe  
                           180                          185                          190  
 Ser Val Asp Phe Ala Asp Phe Gly Ser Gly Ser Ser Gln Glu Leu Lys  
           195                          200                          205  
 Asp Val Met Ser Gly Ile Ala Ser Ile Ile Gly Arg Pro Asn Phe Ala  
           210                          215                          220  
 Asp Cys Phe Pro Leu Leu Arg Leu Val Asp Pro Gln Gly Ile Phe Arg  
           225                          230                          235                          240  
 Gln Thr Thr Leu His Phe Asn Lys Cys Phe Lys Ile Phe Asp Glu Ile  
                           245                          250                          255  
 Ile Arg Gln Arg Leu Gln Thr Asn Asp Ser Gly Thr Lys Ser Asp Met  
           260                          265                          270  
 Leu Lys Glu Leu Leu Glu Ile Asn Gln Lys Asp Glu Ser Glu Leu Ser  
           275                          280                          285  
 Phe Asp Glu Ile Lys His Leu Leu Leu Asp Leu Leu Val Ala Gly Thr  
           290                          295                          300



Asp Thr Thr Ser Val Thr Val Glu Trp Ala Met Thr Glu Leu Val Arg  
305 310 315 320

His Pro Glu Lys Met Ser Lys Ala Arg Asn Glu Leu Arg Asn Val Val  
325 330 335

Gly Leu Asn Lys Glu Ile Gln Glu Ser Asp Ile Ser Arg Leu Pro Tyr  
340 345 350

Leu Arg Ala Val Val Lys Glu Ser Phe Arg Leu His Pro Ala Thr Pro  
355 360 365

Leu Ser Val Pro His Lys Ala Asp Glu Glu Ala Glu Ile Asn Gly Tyr  
370 375 380

Ile Val Pro Lys Gly Ala Gln Val Leu Met Asn Val Trp Ala Ile Gly  
385 390 395 400

Arg Asp Ser Ser Ile Trp Arg Asn Pro Asp Val Phe Met Pro Glu Arg  
405 410 415

Phe Leu Glu Thr Glu Ile Asp Val Arg Gly Gln His Phe Glu Leu Leu  
420 425 430

Pro Phe Gly Gly Gly Arg Arg Ile Cys Val Gly Leu Pro Leu Ala Tyr  
435 440 445

Arg Met Ile His Leu Val Leu Ala Thr Phe Ile Ser Asp Tyr Asp Trp  
450 455 460

Lys Leu Glu Gly Gly Leu Lys Thr Glu Glu Met Asp Met Ser Glu Lys  
465 470 475 480

Phe Gly Leu Thr Leu Gln Lys Ala Ile Pro Leu Lys Ala Leu Pro Val  
485 490 495

Lys Ile

<210> 59

<211> 1545

<212> DNA

<213> Sesamum indicum

<220>

<223> SiP236

<400> 59

```

atggcaaacc ccattgattt tctcctcagc ccaacacccat atgtggctac aacccttctt 60
tacgtttctt tctctgttct tattgttaga ttcctcagca gaaagctgct cgggaagaag 120
aggtaccatc ccattgggtgg taccgtgttc aaccagctgc tgaacttcta taggttgcat 180
gattatatgg ctgatcttgc agggaagtac aagacttaca gactgattgc cccttttcgg 240
actgaggtct atacatctga ccccgcta atgtgagcaca tgttgaaaac gaatttcgaa 300
agttatggca agggacctta caattgcagc attctggggg atttgtttgg tgaaggaatt 360
ttcgcaatcg atggccataa gtggaggagg cagagaaaag tgtcaagcct tgagttttct 420
acaagggttc tgagggatta cagtagcatc gtcttcagga aaaacgccgt aaggctcgca 480
aaaattctgt ctggagctgc aacttccaac caaccagtgg atattcaaga tcttttcatt 540
aatcaactt ttgattctat ttcggaagtt gctttaggag ttgagcttga cagcttgggt 600
ggttcaaatg aagaaggtgc caaatctagc attgctgcag acgacgtgag tatgaggaca 660
ctttggagat acgtggatgt tctgtggaag ttaaagagag ctctaaatgt tggttcagaa 720
gcaaaactga agaaaagcct tcaagtgggt gatgaatttg tgtataagct gattcatagt 780
aggactcagc aaatgaacat gccaggaaat gattctgtta tgcagctgaa gaaagacgac 840
atthttgcaa gattcttgca acttactgag gccactccca agtacttgag ggacataaca 900
ataagcttta tagttgctgg taaagacaca acagcaacaa ctctctcctg gtttatttac 960
atgctttgca agtatcctca tgttcaggaa aagggtggagc aagagataaa agatgcgaca 1020
ggctgcaaag aggtagcaga tatctcagaa ttttcagcct gtgtgacaga agaagctttg 1080
ggcaagatgc attatctcca tgcagcattg acagaaacac tgaggattta tccagcagtt 1140
gcggtggatg caaagcaatg tttgtgtgat gatataatgc cggatgggtt cagtgttaag 1200
aagggggaca tgggtggcta tcaaccatat gcaatgggaa ggatgaaatc catatggggt 1260
aatgatgcag aagagttcaa accagagaga tggcttgaca aaaacggtt cttccagcag 1320
gccagccctt ttaagtttac agctttccag gccggccctc gtctttgttt ggggaaagag 1380
tttgcttata ggcagatgaa gatattctca gccattctgc tgagattctt taccatgaaa 1440
ctaagtgatg aaagaaagac agtaaactac agaccaatgc tcactcttct catcgacggt 1500
ggtctcattg tccgcccctt tcacagaatg gacgagaaaa ctgca 1545

```

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 515

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sesamum indicum

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; SiP236

&lt;400&gt; 60

```

Met Ala Asn Pro Ile Asp Phe Leu Leu Ser Pro Thr Pro Tyr Val Ala
  1             5             10             15

```

```

Thr Thr Leu Leu Tyr Val Leu Phe Ser Val Leu Ile Val Arg Phe Leu
      20             25             30

```

```

Ser Arg Lys Leu Leu Gly Lys Lys Arg Tyr His Pro Ile Gly Gly Thr
    35             40             45

```

```

Val Phe Asn Gln Leu Leu Asn Phe Tyr Arg Leu His Asp Tyr Met Ala
    50             55             60

```

```

Asp Leu Ala Gly Lys Tyr Lys Thr Tyr Arg Leu Ile Ala Pro Phe Arg

```

65	70	75	80
Thr Glu Val Tyr Thr Ser Asp Pro Ala Asn Val Glu His Met Leu Lys	85	90	95
Thr Asn Phe Glu Ser Tyr Gly Lys Gly Pro Tyr Asn Cys Ser Ile Leu	100	105	110
Gly Asp Leu Phe Gly Glu Gly Ile Phe Ala Ile Asp Gly His Lys Trp	115	120	125
Arg Glu Gln Arg Lys Val Ser Ser Leu Glu Phe Ser Thr Arg Val Leu	130	135	140
Arg Asp Tyr Ser Ser Ile Val Phe Arg Lys Asn Ala Val Arg Leu Ala	145	150	155
Lys Ile Leu Ser Gly Ala Ala Thr Ser Asn Gln Pro Val Asp Ile Gln	165	170	175
Asp Leu Phe Met Lys Ser Thr Phe Asp Ser Ile Ser Glu Val Ala Leu	180	185	190
Gly Val Glu Leu Asp Ser Leu Gly Gly Ser Asn Glu Glu Gly Ala Lys	195	200	205
Phe Ser Ile Ala Ala Asp Asp Val Ser Met Arg Thr Leu Trp Arg Tyr	210	215	220
Val Asp Val Leu Trp Lys Leu Lys Arg Ala Leu Asn Val Gly Ser Glu	225	230	235
Ala Lys Leu Lys Lys Ser Leu Gln Val Val Asp Glu Phe Val Tyr Lys	245	250	255
Leu Ile His Ser Arg Thr Gln Gln Met Asn Met Pro Gly Asn Asp Ser	260	265	270
Val Met Gln Leu Lys Lys Asp Asp Ile Leu Ser Arg Phe Leu Gln Leu	275	280	285
Thr Glu Ala Thr Pro Lys Tyr Leu Arg Asp Ile Thr Ile Ser Phe Ile	290	295	300
Val Ala Gly Lys Asp Thr Thr Ala Thr Thr Leu Ser Trp Phe Ile Tyr	305	310	315
Met Leu Cys Lys Tyr Pro His Val Gln Glu Lys Val Glu Gln Glu Ile	325	330	335

Lys Asp Ala Thr Gly Cys Lys Glu Val Ala Asp Ile Ser Glu Phe Ser  
340 345 350

Ala Cys Val Thr Glu Glu Ala Leu Gly Lys Met His Tyr Leu His Ala  
355 360 365

Ala Leu Thr Glu Thr Leu Arg Ile Tyr Pro Ala Val Ala Val Asp Ala  
370 375 380

Lys Gln Cys Leu Cys Asp Asp Ile Met Pro Asp Gly Phe Ser Val Lys  
385 390 395 400

Lys Gly Asp Met Val Ala Tyr Gln Pro Tyr Ala Met Gly Arg Met Lys  
405 410 415

Ser Ile Trp Gly Asn Asp Ala Glu Glu Phe Lys Pro Glu Arg Trp Leu  
420 425 430

Asp Lys Asn Gly Cys Phe Gln Gln Ala Ser Pro Phe Lys Phe Thr Ala  
435 440 445

Phe Gln Ala Gly Pro Arg Leu Cys Leu Gly Lys Glu Phe Ala Tyr Arg  
450 455 460

Gln Met Lys Ile Phe Ser Ala Ile Leu Leu Arg Phe Phe Thr Met Lys  
465 470 475 480

Leu Ser Asp Glu Arg Lys Thr Val Asn Tyr Arg Pro Met Leu Thr Leu  
485 490 495

Leu Ile Asp Gly Gly Leu Ile Val Arg Pro Phe His Arg Met Asp Glu  
500 505 510

Lys Thr Ala  
515

<210> 61

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence, Bam-SST-FW2

<400> 61

tggatcccaa ctcatagagt actcaaaaac gctt

<210> 62  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
 Synthesized Primer Sequence, SiP189-Nco-RV

<400> 62  
 gcaaagatc aaccatggtg ttct 24

<210> 63  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
 Synthesized Primer Sequence, GR-SST-RV1

<400> 63  
 cacatgaacg agacgaactg ggtttgg 27

<210> 64  
 <211> 506  
 <212> PRT  
 <213> Sesamum radiatum

<220>  
 <223> SrSiP189

<400> 64  
 Met Glu Ala Glu Met Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Leu Thr Phe Ala Ile  
     1                    5                    10                    15  
 Phe Met Val Tyr Arg Ile Leu Ser Asn Ser Gln Glu Lys Ser Ser Leu  
                     20                    25                    30  
 Ile Lys Leu Pro Pro Ser Pro Pro Gly Trp Leu Pro Val Ile Gly His  
                     35                    40                    45  
 Val His Leu Met Lys Asn Leu Leu His Arg Thr Leu Tyr Asp Phe Ser  
                     50                    55                    60

Gln Lys Leu Gly Pro Ile Phe Ser Leu Arg Phe Gly Thr Arg Leu Val  
 65 70 75 80  
 Val Val Val Ser Ser Ser Ser Leu Val Glu Glu Cys Phe Thr Lys Tyr  
 85 90 95  
 Asp Ile Val Leu Ala Asn Arg Pro Gln Pro Ser Val Asp Arg Arg Ser  
 100 105 110  
 Leu Gly Phe Ser Thr Thr Ser Val Ile Gly Ala Pro Tyr Gly Asp His  
 115 120 125  
 Trp Arg Asn Leu Arg Lys Leu Cys Asp Leu Glu Val Phe Ala Pro Thr  
 130 135 140  
 Arg Leu Ala Ser Phe Leu Ser Ile Arg Leu Asp Glu Arg Asp Arg Met  
 145 150 155 160  
 Ile Ser Ser Leu Tyr Lys Ile Ser Ser Ala Gly Phe Ala Lys Val Asn  
 165 170 175  
 Leu Glu Thr Lys Ile Val Glu Leu Thr Phe Asn Asn Ile Met Arg Met  
 180 185 190  
 Val Ala Gly Lys Arg Tyr Tyr Gly Glu Glu Ala Glu Asp Asp Glu Glu  
 195 200 205  
 Ala Lys Arg Phe Arg Asp Leu Thr Lys Glu Ala Leu Glu Leu Thr Ser  
 210 215 220  
 Ala Ser Asn Pro Gly Glu Ile Phe Pro Ile Leu Arg Trp Leu Gly Phe  
 225 230 235 240  
 Asn Gly Leu Glu Lys Lys Leu Ala Val His Ala Arg Lys Thr Asp Glu  
 245 250 255  
 Phe Met Gln Gly Leu Leu Asp Glu His Arg Arg Gly Glu Arg Gln Asn  
 260 265 270  
 Thr Met Val Asp His Leu Leu Ser Leu Gln Glu Ser Gln Pro Glu Tyr  
 275 280 285  
 Tyr Thr Asp Glu Ile Ile Thr Gly Leu Ile Val Ala Leu Ile Ile Ala  
 290 295 300  
 Gly Thr Asp Ala Ser Val Val Thr Thr Glu Trp Ala Met Ser Leu Ile  
 305 310 315 320  
 Leu Asn His Pro Gln Val Leu Glu Lys Ala Arg Lys Glu Leu Asp Thr  
 325 330 335

Leu Val Gly His Glu Arg Met Val Asp Glu His Asp Leu Pro Lys Leu  
 340 345 350

Arg Tyr Leu His Cys Ile Val Leu Glu Thr Leu Arg Leu Phe Pro Ser  
 355 360 365

Val Pro Thr Leu Val Pro His Glu Pro Ser Glu Asp Cys Lys Ile Gly  
 370 375 380

Gly Tyr Asn Val Pro Lys Gly Thr Met Ile Leu Val Asn Ala Trp Ala  
 385 390 395 400

Ile His Arg Asp Pro Lys Val Trp Asp Asp Pro Leu Ser Phe Lys Pro  
 405 410 415

Asp Arg Phe Glu Thr Met Glu Val Glu Thr His Lys Leu Leu Pro Phe  
 420 425 430

Gly Met Gly Arg Arg Ala Cys Pro Gly Ala Gly Leu Ala Gln Lys Phe  
 435 440 445

Val Gly Leu Ala Leu Gly Ser Leu Ile Gln Cys Phe Glu Trp Glu Arg  
 450 455 460

Met Ser Ala Glu Lys Ile Asp Leu Asn Glu Gly Ser Gly Ile Thr Leu  
 465 470 475 480

Pro Lys Ala Lys Thr Leu Glu Ala Met Cys Lys Pro Arg His Ile Met  
 485 490 495

Glu Arg Val Leu Arg Gln Val Ser Asn Val  
 500 505

<210> 65

<211> 1518

<212> DNA

<213> Sesamum radiatum

<220>

<223> SrSiP189

<400> 65

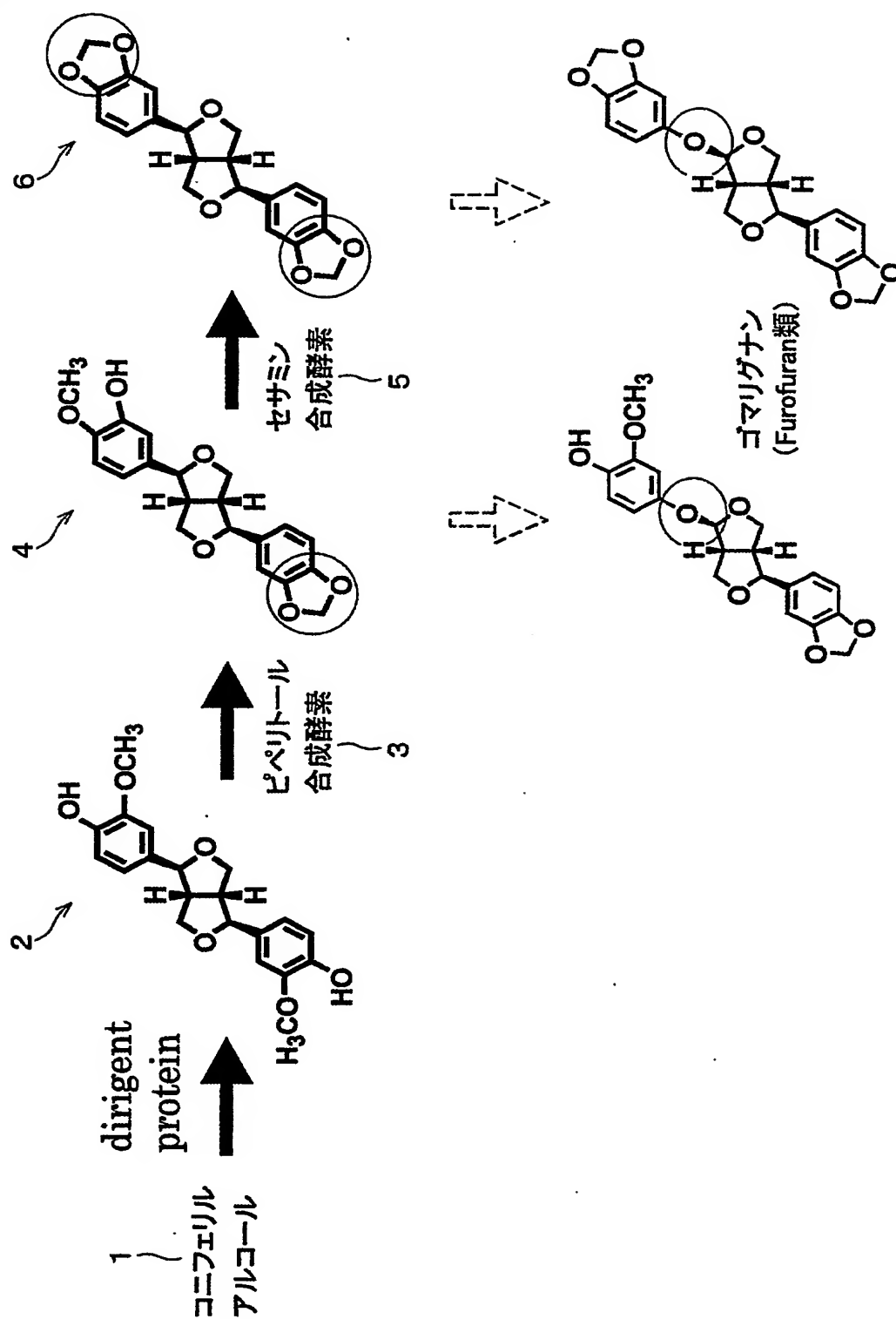
atggaagctg aaatgctata ttcagctctc gctctcacct tcgcatatt catggtttac 60  
 agaattcttt ctaattcgca ggagaaaagc agcctgatta agctgccgcc gagcccgccg 120  
 gggtggctcc cggatgatcg ccacgttcat ctcataaaaa atctcctcca tagaacacta 180  
 tacgacttct cccagaaact gggacccata tttccctcc gggttcggcac ccgcctcgtg 240  
 gtagtggtgt cctcctcctc cctggtcgag gaatgtttca ccaagtagca cattgtcttg 300

gccaaccgcc ctcagccctc tgtcgaccgg cgctcactcg gggttcagcac caccagcgta 360  
atcggcgccc cgtacgggga ccatcggcgc aacctgcgaa agttgtgcga tcttgaagta 420  
ttcgccccga cccgtctcgc ctcgttttta tccatcaggc ttgacgagag ggaccgcatg 480  
atttcgtcgt tgtacaaaat ctcgtccgcc ggtttcgcga aggtgaattt ggagacgaag 540  
attgttgagc tgacgtttta taacataatg aggatgggtg cggggaagag atactatggg 600  
gaggaggcgg aggacgacga ggaggcgaag aggttcaggg acctgacgaa ggaggctttg 660  
gagttgacga gcgcttccaa tcctgggtgag atatttccaa tattgcggtg gcttggtttc 720  
aatgggttgg agaagaagct ggctgttcac gcgcggaaga cggatgagtt catgcaaggg 780  
ctgctggacg aacaccgacg gggcgagcgc cagaacacca tggttgatca tttgctttcg 840  
ttgcaggaat ctcaacctga gtactacact gatgaaatca tctactggcct catagttagc 900  
ttgataattg cgggaacgga tgcacgggtt gtaactacag aatgggcatg gtcccttata 960  
ctaaatcatc cccaagtact tgaagggtt agaaaagaac tggacactct agtaggacac 1020  
gaacgcatgg tcgatgaaca tgatctgccc aaactacgtt accttactg catagtcttg 1080  
gagaccttaa gggtatttcc ttctgttcca acgttgggtg cacacgaacc atcggaggat 1140  
tgtaaaattg ggggatacaa tgtccccaag gggacaatga tactggtgaa tgcttgggca 1200  
atacaccgag accccaaggt gtgggacgac cccttgagct ttaagcccga caggtttgag 1260  
acaatggaag tggagacaca caagctgttg ccgttcggga tgggcaggag agcgtgtccc 1320  
ggagctggat tggcgcagaa gtttgtgggg ttggctttgg ggtcgctgat tcagtgtttc 1380  
gagtgggaga gaatgagtgc ggagaaaatt gacttgaacg aaggttctgg gataaccttg 1440  
cctaaagcta agacgttgga agccatgtgc aaacctagac atatcatgga gagagttctt 1500  
cgtcaggttt cgaacgtc 1518

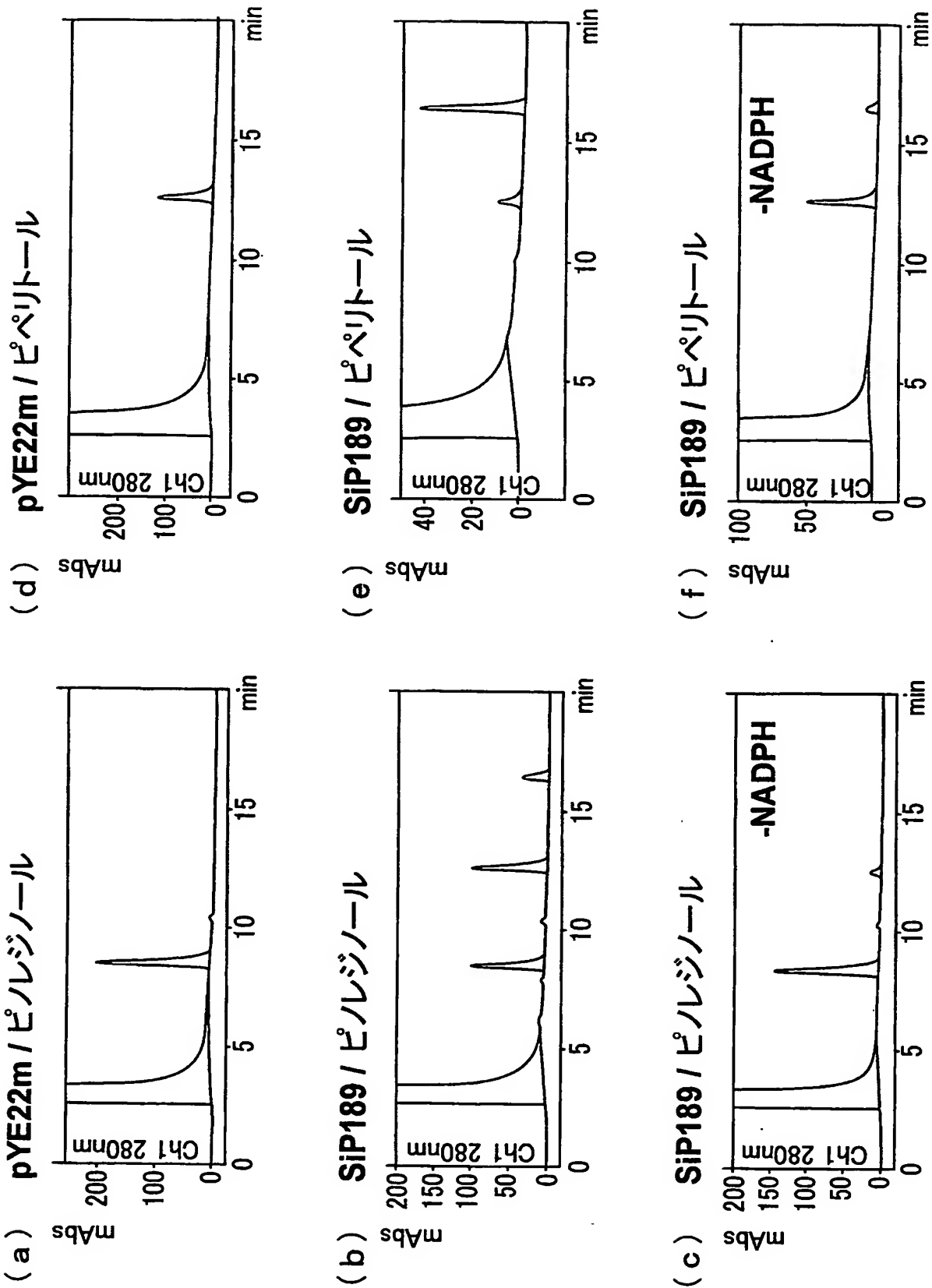


【書類名】 図面

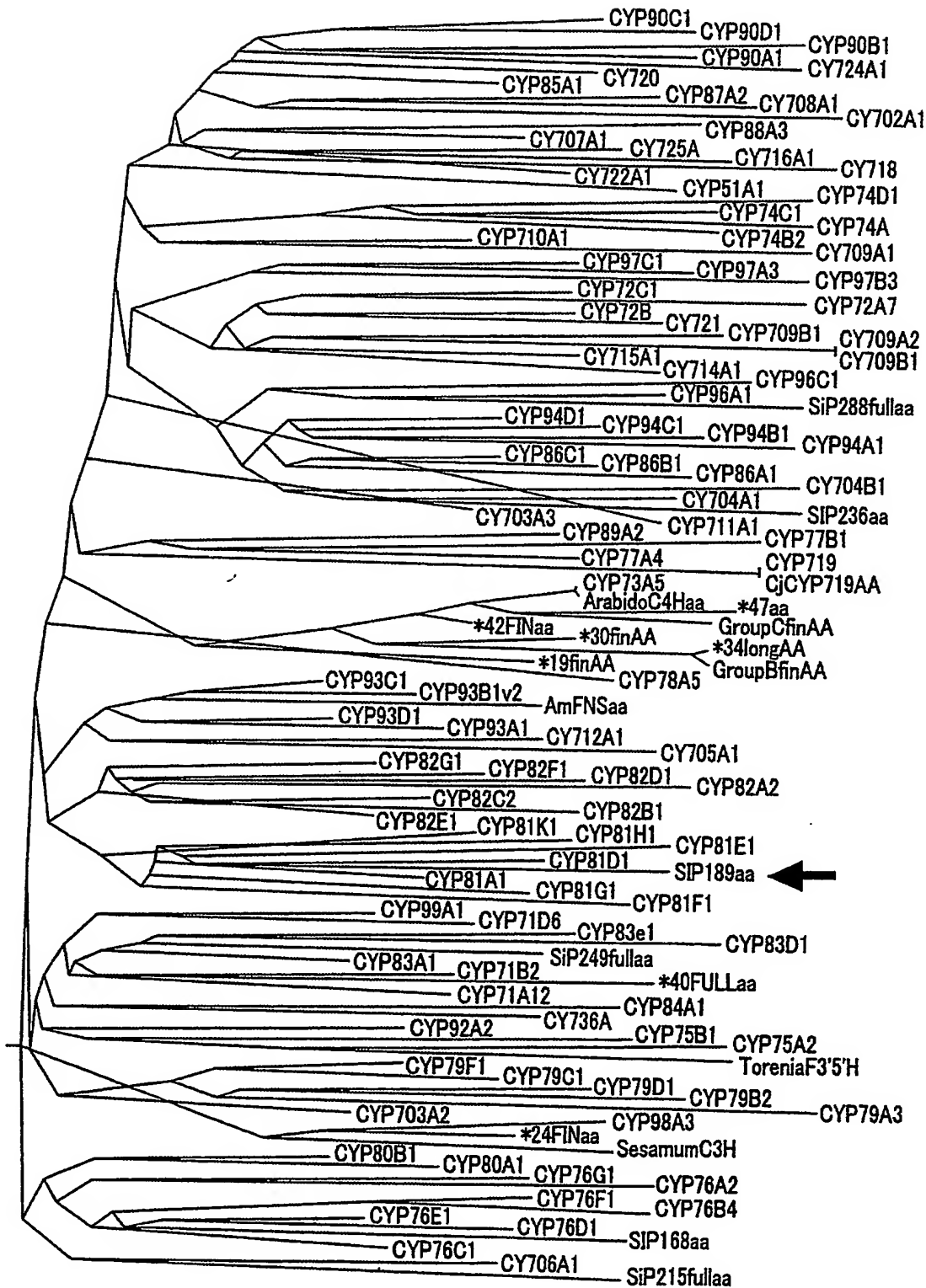
【図1】



【図 2】



【図 3】



【図 4】

## &gt; Blastx Search (SST vs PIR)

030709 update

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer,  
Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997),  
"Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search  
programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

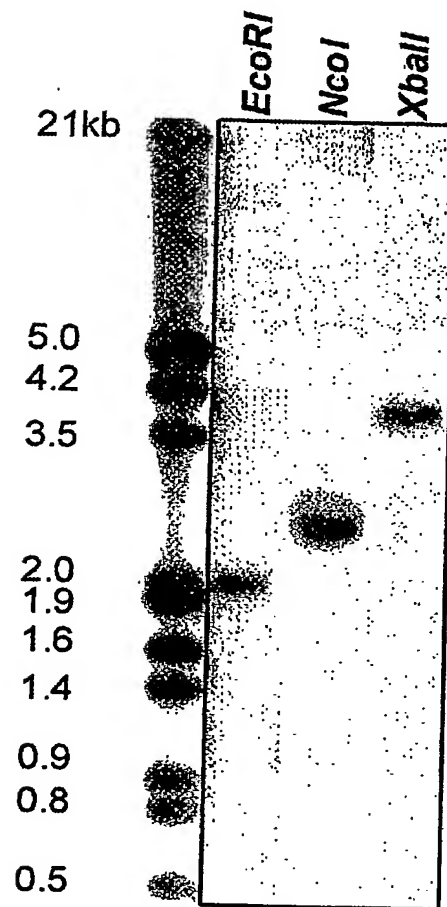
Query= BXP184.2003.08.12  
(1521 letters)

Database: pir1.fst; pir2.fst; pir3.fst; pir4.fst  
283,329 sequences; 96,175,589 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
<u>T04730</u> (PIR) cytochrome P450 homolog F6G17.10 - Arabidopsis thal...	<u>494</u>	e-139
<u>C85441</u> (PIR) cytochrome P450-like protein [imported] - Arabidopsis	<u>494</u>	e-139
<u>T52174</u> (PIR) cytochrome P450 monooxygenase [imported] - Arabidopsis	<u>487</u>	e-137
<u>B85441</u> (PIR) cytochrome P450-like protein [imported] - Arabidopsis	<u>481</u>	e-135
<u>T04731</u> (PIR) cytochrome P450 homolog F6G17.20 - Arabidopsis thal...	<u>480</u>	e-135
<u>T10896</u> (PIR) cytochrome P450 (EC 1.14.-.-) 81B1c - Jerusalem art...	<u>468</u>	e-131
<u>A85441</u> (PIR) cytochrome P450-like protein [imported] - Arabidopsis	<u>464</u>	e-130
<u>T00510</u> (PIR) probable cytochrome P450 At2g23220 [imported] - Ara...	<u>457</u>	e-128
<u>T00513</u> (PIR) cytochrome P450 homolog At2g23190 - Arabidopsis tha...	<u>453</u>	e-127
<u>B96691</u> (PIR) probable cytochrome P450 F28G11.4 [imported] - Arab...	<u>444</u>	e-124

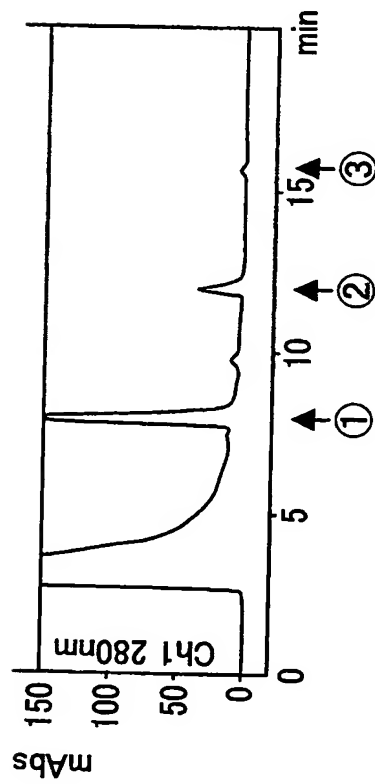
【図 5】



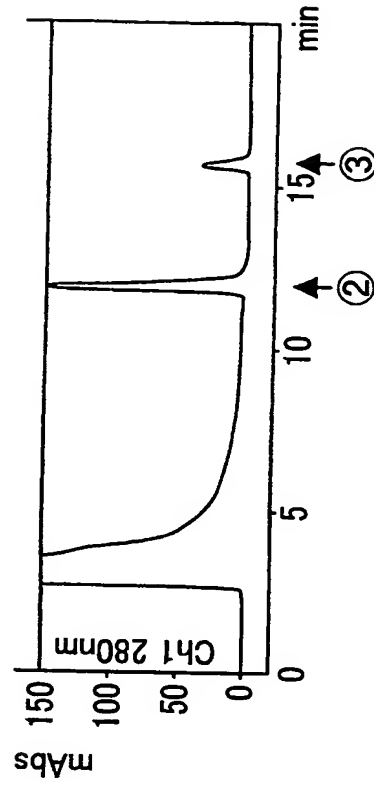
【図 6】

- ↑① ピノジノール  
↑② ピペリトール  
↑③ セサミン

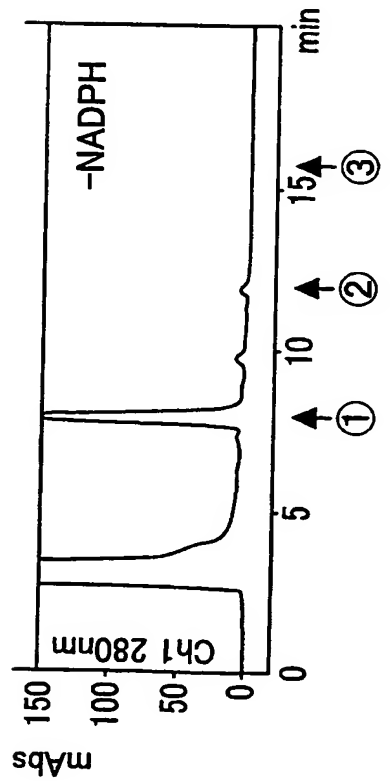
(a) SrSiP189/ピノジノール



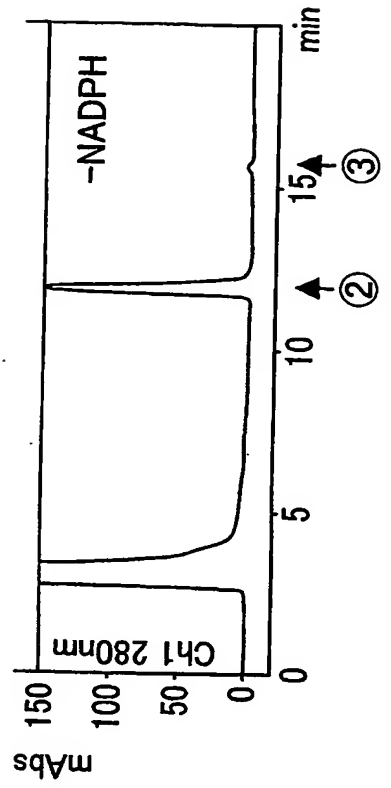
(b) SrSiP189/ピペリトール



(c) SrSiP189/ピノジノール



(d) SrSiP189/ピペリトール



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ピノレジノールからピペリトールおよびピペリトールからセサミンへの反応を触媒する酵素の遺伝子を得ることを目的とする。

【解決手段】 ゴマ種子cDNAライブラリーからゴマ種子チトクロームP450遺伝子群（SiP遺伝子）を取得し、酵母において発現させた。その組換え酵母からミクロソーム画分を回収し、ピノレジノールまたはピペリトールと反応させ、それぞれからピペリトールまたはセサミンが生成されるかどうかをHPLCにより分析した。その結果、ピノレジノールからピペリトールおよびピペリトールからセサミンへの二つの反応を触媒するタンパク質および当該タンパク質をコードする遺伝子を取得した。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 4 3 2 3 8 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 0 0 0 0 0 1 9 0 4 ]

1. 変更年月日	1 9 9 0 年 8 月 1 3 日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府大阪市北区堂島浜 2 丁目 1 番 4 0 号
氏 名	サントリー株式会社



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**